

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
13. Juni 2002 (13.06.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/46756 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation: G01N 33/543, 21/77, C12Q 1/68 (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): Zeptosens AG [CH/CH]; Benkenstrasse 254, CH-4108 Witterswil (CH).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/12787 (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ABEL, Andreas, P. [CH/CH]; Rotbergstrasse 16a, CH-4054 Basel (CH). SCHÜRMANN-MADER, Eveline [CH/CH]; Talhübel 1, CH-5089 Zeihen (CH).
- (22) Internationales Anmeldedatum: 5. November 2001 (05.11.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 2245/00 17. November 2000 (17.11.2000) CH (74) Gemeinsamer Vertreter: Zeptosens AG; Benkenstrasse 254, CH-4108 Witterswil (CH).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: KIT AND METHOD FOR MULTI-ANALYTE DETERMINATION WITH ARRANGEMENTS FOR THE POSITIONALLY RESOLVED REFERENCING OF STIMULATING LIGHT INTENSITY

(54) Bezeichnung: KIT UND VERFAHREN ZUR MULTIANALYTBESTIMMUNG, MIT VORKEHRUNGEN ZUR ORTSAUFGELOSTEN REFERENZIERUNG EINER ANREGUNGSLICHTINTENSITÄT

(57) Abstract: The invention relates to differing embodiments of a kit for the simultaneous qualitative and/or quantitative detection of number of analytes, comprising: a sensor platform; at least one array of biological, biochemical or synthetic recognition elements, for the specific recognition and/or binding of said analytes and/or specific interaction with said analytes, directly bonded in discrete determination zones (d), or bonded by means of an adhesive layer and immobilised on the sensor platform; a passivation layer, comprising chemically-neutral compounds relative to the analytes or a passivation adhesive layer with a chemically-neutral surface relative to the analytes, arranged between the determination zones and a distribution throughout the sensor platform of luminescence-marked molecules, as homogeneous as possible and associated with the passivation layer or the passivation adhesive layer, which serve for the positionally resolved referencing of the stimulation light intensity available in the determination zone or the region thereof. The invention further relates to various embodiments of a kit for simultaneous qualitative and/or quantitative detection of number of analytes, comprising: a sensor platform; a thin layer (g) applied to the sensor platform; at least one array of biological, biochemical or synthetic recognition elements, for the specific recognition and/or binding of said analytes and/or specific interaction with said analytes, directly bonded in discrete determination zones (d), or bonded by means of an adhesive layer and immobilised on the layer (g); a passivation layer, comprising chemically-neutral compounds relative to the analytes or a passivation adhesive layer with a chemically-neutral surface relative to the analytes, arranged between the determination zones and a distribution throughout the sensor platform of luminescence-marked molecules, as homogeneous as possible and associated with the layer (g), applied to the sensor platform, which serve for the positionally resolved referencing of the stimulation light intensity available in the determination zone or the region thereof. The invention furthermore relates to a method for the detection of one or several analytes using said kits and the application thereof.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft verschiedene Ausführungsformen eines Kits zum gleichzeitigen qualitativen und/oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten, umfassend: eine Sensorplattform; mindestens ein Array von in diskreten Messbereichen (d) direkt, oder über eine Haftvermittlungsschicht, auf der Sensorplattform immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zur spezifischen Erkennung und/oder Bindung besagter Analyten und/oder spezifischen Wechselwirkung mit besagten Analyten; eine Passivierungsschicht aus gegenüber den Analyten "chemisch neutralen" Verbindungen oder einer passivierten Haftvermittlungsschicht mit einer gegenüber den Analyten "chemisch neutralen" Oberfläche zwischen den Messbereichen, wobei mit der Passivierungsschicht oder der passivierten Haftvermittlungsschicht in einer möglichst homogenen Verteilung über die Sensorplattform lumineszenzmarkierte Moleküle assoziiert sind, welche der orts aufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen oder in deren Umgebung verfügbaren Anregungslichtintensität dienen. Die Erfindung betrifft ausserdem verschiedene Ausführungsformen eines Kits zum Gleichzeitigen qualitativen und/oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten, umfassend: eine Sensorplattform; eine auf der Sensorplattform aufgebrachte dünne Schicht (g); mindestens ein Array von in diskreten Messbereichen (d) direkt, oder über eine Haftvermittlungsschicht, auf der Schicht (g) immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 02/46756 A1

BEST AVAILABLE COPY

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),

OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

Erkennungselementen zur spezifischen Erkennung und/oder Bindung besagter Analyten und/oder spezifischen Wechselwirkung mit besagten Analyten; eine Passivierungsschicht aus gegenüber den Analyten "chemisch neutralen" Verbindungen oder einer passivierten Haftvermittlungsschicht mit einer gegenüber den Analyten "chemisch neutralen" Oberfläche zwischen den Messbereichen, wobei mit auf der Sensorplattform aufgetragenen Schicht (g) in einer möglichst homogenen Verteilung über die Sensorplattform lumineszenzmarkierte Moleküle assoziiert sind, welche der orts aufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen oder in deren Umgebung verfügbaren Anregungslichtintensität dienen. Die Erfindung betrifft auch mit den erfindungsgemässen Kits durchgeführte Verfahren zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten und deren Verwendung.

## KIT UND VERFAHREN ZUR MULTIANALYTBESTIMMUNG, MIT VORKEHRUNGEN ZUR ORTSAUFGELOESTEN REFERENZIERUNG EINER ANREGUNGSLICHTINTENSITAET

Die Erfindung betrifft verschiedene Ausführungsformen eines Kits zum gleichzeitigen qualitativen und / oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten, umfassend

- eine Sensorplattform
- mindestens ein Array von in diskreten Messbereichen (d) direkt, oder über eine Haftvermittlungsschicht, auf der Sensorplattform immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zur spezifischen Erkennung und / oder Bindung besagter Analyten und / oder spezifischen Wechselwirkung mit besagten Analyten,
- eine Passivierungsschicht aus gegenüber den Analyten "chemisch neutralen" Verbindungen oder einer passivierten Haftvermittlungsschicht mit einer gegenüber den Analyten „chemisch neutralen“ Oberfläche zwischen den Messbereichen,

wobei mit der Passivierungsschicht oder der passivierten Haftvermittlungsschicht in einer möglichst homogenen Verteilung über die Sensorplattform lumineszenzmarkierte Moleküle assoziiert sind, welche der orts aufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen oder in deren Umgebung verfügbaren Anregungslichtintensität dienen.

Die Erfindung betrifft ausserdem verschiedene Ausführungsformen eines Kits zum gleichzeitigen qualitativen und / oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten, umfassend

- eine Sensorplattform
- eine auf der Sensorplattform aufgebrachte dünne Schicht (g)
- mindestens ein Array von in diskreten Messbereichen (d) direkt, oder über eine Haftvermittlungsschicht, auf der Schicht (g) immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zur spezifischen Erkennung und / oder Bindung besagter Analyten und / oder spezifischen Wechselwirkung mit besagten Analyten,
- eine Passivierungsschicht aus gegenüber den Analyten "chemisch neutralen" Verbindungen oder einer passivierten Haftvermittlungsschicht mit einer gegenüber den Analyten „chemisch neutralen“ Oberfläche zwischen den Messbereichen,

wobei mit auf der Sensorplattform aufgetragenen Schicht (g) in einer möglichst homogenen Verteilung über die Sensorplattform lumineszenzmarkierte Moleküle assoziiert sind, welche der orts aufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen oder in deren Umgebung verfügbaren Anregungslichtintensität dienen.

Die Erfindung betrifft auch mit den erfindungsgemässen Kits durchgeführte Verfahren zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten und deren Verwendung.

Zur Bestimmung einer Vielzahl von Analyten sind gegenwärtig vor allem Verfahren verbreitet, in denen in sogenannten Mikrotiterplatten der Nachweis unterschiedlicher Analyten in diskreten Probenbehältnissen oder "Wells" dieser Platten erfolgt. Am weitesten verbreitet sind dabei Platten mit einem Raster von 8 x 12 Wells auf einer Grundfläche von typischerweise ca. 8 cm x 12 cm, wobei zur Füllung eines einzelnen Wells ein Volumen von einigen hundert Mikrolitern erforderlich ist. Für zahlreiche Anwendungen wäre es jedoch wünschenswert, mehrere Analyten in einem einzigen Probenbehältnis, unter Einsatz eines möglichst kleinen Probenvolumens gleichzeitig zu bestimmen.

In der US-P 5,747,274 werden Messanordnungen und Verfahren zur Früherkennung eines Herzinfarkts, durch die Bestimmung mehrerer von mindestens drei Herzinfarktmarkern beschrieben, wobei die Bestimmung dieser Marker in individuellen oder in einem gemeinsamen Probenbehältnis erfolgen kann, wobei im letzteren Falle, der gegebenen Beschreibung folgend, ein einziges Probenbehältnis als ein durchgehender Flusskanal ausgebildet ist, dessen eine Begrenzungsfläche beispielsweise eine Membran bildet, auf der Antikörper für die drei verschiedenen Marker immobilisiert sind. Es gibt jedoch keine Hinweise auf eine Bereitstellung von mehreren derartigen Probenbehältnissen oder Flusskanälen auf einem gemeinsamen Träger. Ausserdem werden keine geometrischen Angaben über die Grössen der Messflächen gegeben.

In den WO 84/01031, US-P 5,807,755, US-P 5,837,551 und US-P 5,432,099 wird die Immobilisierung für den Analyten spezifischer Erkennungselemente in Form kleiner "Spots" mit teilweise deutlich unter 1 mm<sup>2</sup> Fläche auf festen Trägern vorgeschlagen, um durch Bindung eines nur kleinen Teils vorhandener Analytmoleküle eine nur von der Inkubationszeit abhängige, aber – in Abwesenheit eines kontinuierlichen Flusses – vom absoluten Probenvolumen im wesentlichen unabhängige Konzentrationsbestimmung des

Analyten vornehmen zu können. Die in den zugehörigen Ausführungsbeispielen beschriebenen Messanordnungen beruhen auf Fluoreszenznachweisen in konventionellen Mikrotiterplatten. Dabei werden auch Anordnungen beschrieben, in denen Spots von bis zu drei unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Antikörpern in einem gemeinsamen Mikrotiterplattenwell ausgemessen werden. Den in diesen Patentschriften dargelegten theoretischen Überlegungen folgend, wäre eine Minimierung der Spotgrösse wünschenswert. Limitierend wirke jedoch die minimale Signalthöhe, die vom Untergrundsignal unterschieden werden könne.

Zur Erreichung tieferer Nachweisgrenzen sind in den vergangenen Jahren zahlreiche Messanordnungen entwickelt worden, in denen der Nachweis des Analyten auf dessen Wechselwirkung mit dem evaneszenten Feld beruht, welches mit der Lichtleitung in einem optischen Wellenleiter verbunden ist, wobei auf der Oberfläche des Wellenleiters biochemische oder biologische Erkennungselemente zur spezifischen Erkennung und Bindung der Analytmoleküle immobilisiert sind.

Koppelt man eine Lichtwelle in einen optischen Wellenleiter ein, der von optisch dünneren Medien, d.h. Medien mit niedrigerem Brechungsindex umgeben ist, so wird sie durch Totalreflexion an den Grenzflächen der wellenleitenden Schicht geführt. In die optisch dünneren Medien tritt dabei ein Bruchteil der elektromagnetischen Energie ein. Diesen Anteil bezeichnet man als evaneszentes oder quergedämpftes Feld. Die Stärke des evaneszenten Feldes ist sehr stark abhängig von der Dicke der wellenleitenden Schicht selbst sowie vom Verhältnis der Brechungsindices der wellenleitenden Schicht und der sie umgebenden Medien. Bei dünnen Wellenleitern, d. h. Schichtdicken von derselben oder niedrigerer Dicke als der zu führenden Wellenlänge, können diskrete Moden des geleiteten Lichts unterschieden werden. Derartige Verfahren haben den Vorteil, dass die Wechselwirkung mit dem Analyten auf die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes ins angrenzende Medium, in der Grössenordnung von einigen hundert Nanometern, beschränkt ist und Störsignale aus der Tiefe des Mediums weitgehend vermieden werden können. Die ersten vorgeschlagenen derartigen Messanordnungen beruhten auf hochmultimodalen, selbsttragenden Einsichtwellenleitern, wie beispielsweise Fasern oder Plättchen aus transparentem Kunststoff oder Glas, mit Stärken von einigen hundert Mikrometern bis zu mehreren Millimetern.

Zur Verbesserung der Empfindlichkeit und gleichzeitig einfacheren Herstellung in Massenfabrication wurden planare Dünnschichtwellenleiter vorgeschlagen. Ein planarer Dünnschichtwellenleiter besteht im einfachsten Fall aus einem Dreischichtsystem: Trägermaterial (b), wellenleitende Schicht (a), Superstrat ( bzw. zu untersuchende Probe), wobei die wellenleitende Schicht den höchsten Brechungsindex besitzt. Zusätzliche Zwischenschichten können die Wirkung des planaren Wellenleiters noch verbessern.

Es sind verschiedene Verfahren für die Einkopplung von Anregungslicht in einen planaren Wellenleiter bekannt. Die am frühesten benutzten Verfahren beruhten auf Stirnflächenkopplung oder Prismenkopplung, wobei zur Verminderung von Reflexionen infolge von Luftspalten im allgemeinen eine Flüssigkeit zwischen Prisma und Wellenleiter aufgebracht wird. Diese beiden Methoden sind vor allem in Verbindung mit Wellenleitern relativ grosser Schichtdicke, d. h. insbesondere selbsttragenden Wellenleitern, sowie bei einem Brechungsindex des Wellenleiters von deutlich unter 2 geeignet. Zur Einkopplung von Anregungslicht in sehr dünne, hochbrechende wellenleitende Schichten ist demgegenüber die Verwendung von Koppelgittern eine wesentlich elegantere Methode.

Mit dem Begriff "Lumineszenz" wird in dieser Anmeldung die spontane Emission von Photonen im ultravioletten bis infraroten Bereich nach optischer oder nichtoptischer, wie beispielsweise elektrischer oder chemischer oder biochemischer oder thermischer Anregung, bezeichnet. Beispielsweise sind Chemilumineszenz, Biolumineszenz, Elektrolumineszenz und insbesondere Fluoreszenz und Phosphoreszenz unter dem Begriff "Lumineszenz" mit eingeschlossen.

Zur Erreichung sehr tiefer Nachweisgrenzen erscheinen lumineszenz-basierende Methoden aufgrund grösserer Selektivität der Signalerzeugung besser geeignet als solche Methoden, welche auf einer Änderung des effektiven Brechungsindex beruhen (wie beispielsweise Gitterkoppler-Sensoren oder Verfahren basierend auf Oberflächenplasmonenresonanz). Dabei ist die Lumineszenzanregung auf die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes in das optisch dünnere Medium, also auf die unmittelbare Umgebung des wellenleitenden Bereichs mit einer Eindringtiefe in der Grössenordnung von einigen hundert Nanometern ins Medium beschränkt. Dieses Prinzip wird evaneszente Lumineszenzanregung genannt.

Mittels hochbrechender Dünnschichtwellenleiter, in Kombination mit Lumineszenzdetektion, basierend auf einem nur einige hundert Nanometer dünnen wellenleitenden Film auf einem transparenten Trägermaterial, konnte in den letzten Jahren die Empfindlichkeit deutlich gesteigert werden. Beispielsweise wird in der WO 95/33197 eine Methode beschrieben, in der das Anregungslicht über ein Reliefgitter als diffraktives optisches Element in den wellenleitenden Film eingekoppelt wird. Die Oberfläche der Sensorplattform wird mit einer den Analyten enthaltenden Probe in Kontakt gebracht, und die isotrop angestrahlte Lumineszenz in der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes befindlicher lumineszenzfähiger Substanzen wird mittels geeigneter Messvorrichtungen, wie zum Beispiel Photodioden, Photomultiplier oder CCD-Kameras, gemessen. Es ist auch möglich, den in den Wellenleiter rückgekoppelten Anteil der evaneszent angeregten Strahlung über ein diffraktives optisches Element, zum Beispiel ein Gitter, auszukoppeln und zu messen. Diese Methode ist zum Beispiel in der WO 95/33198 beschrieben.

Ein Nachteil aller oben im Stand der Technik, insbesondere in der WO 95/33197 und der WO 95/33198, beschriebenen Verfahren zur Detektion evaneszent angeregter Lumineszenz mit Dünnschichtwellenleitern liegt jedoch darin, dass auf der als homogener Film ausgebildeten Sensorplattform jeweils nur eine Probe analysiert werden kann. Um weitere Messungen auf derselben Sensorplattform durchführen zu können, sind jedesmal aufwendige Wasch- bzw. Reinigungsschritte notwendig. Dies gilt insbesondere, wenn ein von der ersten Messung verschiedener Analyt detektiert werden soll. Im Falle eines Immunoassays bedeutet dies im allgemeinen, dass die gesamte immobilisierte Schicht auf der Sensorplattform ausgetauscht oder gleich eine neue Sensorplattform als ganzes verwendet werden muss. Insbesondere können also keine gleichzeitigen Bestimmungen mehrerer Analyten durchgeführt werden.

Zur gleichzeitigen oder aufeinanderfolgenden Durchführung von ausschliesslich lumineszenzbasierenden Mehrfachmessungen mit im wesentlichen monomodalen, planaren anorganischen Wellenleitern sind, z. B. in der WO 96/35940, Vorrichtungen (Arrays) bekannt geworden, in denen auf einer Sensorplattform wenigstens zwei getrennte wellenleitende Bereiche angeordnet sind, die getrennt mit Anregungslicht beaufschlagt werden. Die Aufteilung der Sensorplattform in getrennte wellenleitende Bereiche hat allerdings nachteilig zur Folge, dass der Platzbedarf für diskrete Messbereiche, in diskreten wellenleitenden Bereichen auf der gemeinsamen Sensorplattform relativ gross ist und daher



nur eine verhältnismässige geringe Dichte unterschiedlicher Messbereiche (oder sogenannter "features") erreicht werden kann.

Die Verwendung des Begriffs "räumlich getrennter Messbereiche" oder "diskreter Messbereiche" im Sinne der vorliegenden Erfindung wird im nachfolgenden Abschnitt zur genauen Beschreibung der Erfindung genauer definiert.

In der US 5525466 und US 5738992 wird ein optischer Sensor, basierend auf Fluoreszenz-anregung im evaneszenten Feld eines selbsttragender Multimode-Wellenleiters, vorzugsweise faseroptischer Art, beschrieben. Einkopplung von Anregungslicht und Auskopplung von in den Multimode-Wellenleiter rückgekoppeltem Fluoreszenzlicht erfolgen über Stirnflächenein- und -auskopplung. Das dabei detektierte Fluoreszenzsignal zum Analytnachweis ergibt sich aufgrund des Funktionsprinzips solcher Multimode-Wellenleiter als ein einziger integraler Wert für die ganze mit der Probe wechselwirkende Fläche. Vorwiegend zur Normalisierung der Signale, beispielweise zur Berücksichtigung von signalverändernden Oberflächendefekten, sind auf der Sensoroberfläche neben den biochemischen oder biologischen Erkennungselementen zur spezifischen Erkennung und Bindung eines nachzuweisenden Analyten fluoreszente Referenzmaterialien co-immobilisiert. Aufgrund des zugrunde liegenden Sensorprinzips ist jedoch keine orts aufgelöste, sondern nur eine auf den einzelnen, integralen Messwert wirkende Normalisierung möglich. Folglich kann auch der Nachweis unterschiedlicher Analyten nur mittels Verwendung von Labeln unterschiedlicher Anregungswellenlängen oder sequentiell, nach Entfernung vorangehend gebundener Analyten erfolgen. Aus diesen Gründen erscheinen diese Anordnungen, zusammen mit dem beschriebenen Referenzierungsverfahren, für den gleichzeitigen Nachweis einer Vielzahl von Analyten gar nicht oder nur wenig geeignet.

In der WO 97/35181 werden Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung einer oder mehrerer Analyten beschrieben, indem in einem Wellenleiter ausgebildeten "Well" Patches mit unterschiedlichen Erkennungselementen ausgebildet sind, welche mit einer einen oder mehreren Analyten enthaltenden Probenlösung kontaktiert werden. Zu Kalibrationszwecken werden gleichzeitig Lösungen mit definierten Analytkonzentrationen in weitere Wells mit gleichartigen Patches gegeben. Als Beispiel werden je 3 Wells (zur Messung mit Kalibrationslösungen niedriger und hoher Analytkonzentration sowie der aktuellen Probe) mit diskreten und von Patch zu Patch verschiedenen immobilisierten Erkennungselementen zur gleichzeitigen

Bestimmung mehrerer Analyten vorgestellt. Hinweise auf orts aufgelöste Referenzierungen werden nicht gegeben.

In Analytical Chemistry, Vol. 71 (1999), 4344 – 4352 wird ein Multianalyt-Immunoassay auf einem Silicium-Nitrid-Wellenleiter vorgestellt. Es werden bis zu drei Analyten gleichzeitig, auf drei kanalförmig ausgebildeten Erkennungsbereichen (Messbereichen) mit jeweils unterschiedlichen biologischen Erkennungselementen, beschrieben. Analyten und Tracer-Antikörper werden als Mischung in eine die drei Messfelder überdeckende Probenzelle gegeben. Der Background wird jeweils zuvor mit einer spezifisch dafür hergestellten Lösung ohne Analyt gemessen. Aus der Beschreibung ist nicht ersichtlich, ob die Background-Bestimmung orts aufgelöst oder summarisch für die verschiedenen Messbereiche durchgeführt wird. Da eine Regenerierung der Sensorplattform nicht vorgenommen wird, müssen zur Erstellung einer Kalibrationskurve eine Vielzahl von Einzelmessungen mit immer wieder neuen Sensorplattformen durchgeführt werden. Dieses, durch die nur geringe Anzahl von Messfeldern auf einer Sensorplattform sowie durch das Assay-Design bedingte Vorgehen, ist als nachteilig anzusehen, da die Genauigkeit durch die Verwendung unterschiedlicher Sensorplattformen verringert wird und die Dauer des Verfahrens sich deutlich verlängert.

In Analytical Chemistry, Vol. 71 (1999), 3846 – 3852 wird ebenfalls ein Multianalyt-Assay zur gleichzeitigen Bestimmung dreier verschiedener Analyten vorgestellt. Als Beispiel gleichzeitig zu bestimmender Analyten aus den Gruppen Bakterien, Viren und Proteine werden *Bacillus globigii*, MS2-Bakteriophagen und "Staphylococcal enderotoxin B" benutzt, wobei in jeweils zwei zueinander parallelen Reihen (Kanälen) Antikörper gegen diese Analyten auf einem als (selbsttragendem Multimode-) Wellenleiter dienendem Glasplättchen immobilisiert wurden. In dem nachfolgend beschriebenen Multianalyt-Assay wird eine Flusszelle mit zu den immobilisierten Reihen von Erkennungselementen gekreuzten Fliesskanälen auf das Glasplättchen aufgesetzt. Die Sandwich-Immunoassays werden unter sequentieller Zugabe von Waschlösung (Puffer), Probe mit einem oder mehreren Analyten, Waschlösung (Puffer), Tracer-Antikörper (einzeln oder als Cocktail) und Waschlösung (Puffer) durchgeführt. Die lokal gemessenen Fluoreszenzintensitäten werden korrigiert mittels Subtraktion des neben den Messfeldern beobachteten Hintergrundsignals. Hinweise auf eine Berücksichtigung lokaler Variationen der Anregungslichtintensität werden auch hier nicht gegeben. Auch diese Anordnung ermöglicht jedoch nicht, eine ganze Messreihe

zur gleichzeitigen Bestimmung mehrerer Analyten, zusammen mit den notwendigen Kalibrationen, durchzuführen, sondern erfordert dafür entweder die Verwendung mehrerer verschiedener Sensorplattformen oder repetitive, sequentielle Messungen auf einer Plattform mit zwischenzeitlicher Regenerierung, was besonders im Falle von Immunoassays in vielen Fällen nur in begrenztem Umfang möglich ist.

In BioTechniques 27 (1999), 778 – 788 wird eine Anordnung von 96 Wells mit jeweils 4 Arrays aus 36 Spots (d.h. insgesamt 144 Spots pro Well) auf der Grundfläche einer Standard-Mikrotiterplatte (ca. 8 cm x 12 cm), zur Entwicklung von ELISA's (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays) basierend auf Mikroarrays, vorgestellt. Für Zwecke der Positionierung sowie der Kontrolle der Wirksamkeit der eingesetzten Reagentien beim enzymatischen Detektionsschritt des Assays mittels Zugabe von fluoreszentem "Alkaline phosphatase substrate" (ELF®) werden von den 6x6 Arrays jeweils eine Reihe und eine Spalte für "biotinylierte BSA-Marker" reserviert. – Diese Anordnung deutet zwar eine Möglichkeit zu einer deutlichen Erhöhung des Durchsatzes mit klassischen Assays (ELISA's) an, die demonstrierte Empfindlichkeit (13.4 ng/ml rabbit IgG) erscheint jedoch unbefriedigend.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bis jetzt keine gemeinsame Lösung der folgenden Aufgabenstellungen bereitgestellt wurde, die für einen schnellen hochempfindlichen gleichzeitigen Nachweis einer Vielzahl von (d. h. drei oder mehr) Analyten bestehen:

- Gleichzeitige Bestimmung mehrerer Analyten auf einer Sensorplattform mit Nachweisgrenzen im pikomolaren Bereich
- Möglichst einfache Assay-Durchführung zur Minimierung der Anforderungen an die Fluidik (z. B. durch gleichzeitige Zugabe von Mischungen aus einer Probe mit mehreren nachzuweisenden Analyten und mehreren Tracer-Molekülen)
- Örtlich aufgelöste Referenzierung zwecks Berücksichtigung von örtlichen Variationen der Anregungslichtintensität
- Gegebenenfalls gleichzeitige Durchführung von Kalibrationsmessungen auf derselben Sensorplattform.

Gegenstand der Erfindung ist ein Kit zum gleichzeitigen qualitativen und / oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten, umfassend

- eine Sensorplattform

- mindestens ein Array von in diskreten Messbereichen (d) direkt, oder über eine Haftvermittlungsschicht, auf der Sensorplattform immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zur spezifischen Erkennung und / oder Bindung besagter Analyten und / oder spezifischen Wechselwirkung mit besagten Analyten,
- eine Passivierungsschicht aus gegenüber den Analyten "chemisch neutralen" Verbindungen oder einer passivierten Haftvermittlungsschicht mit einer gegenüber den Analyten „chemisch neutralen“ Oberfläche zwischen den Messbereichen,

wobei mit der Passivierungsschicht oder der passivierten Haftvermittlungsschicht in einer möglichst homogenen Verteilung über die Sensorplattform lumineszenzmarkierte Moleküle assoziiert sind, welche der orts aufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen oder in deren Umgebung verfügbaren Anregungslichtintensität dienen.

Im Falle einer nach Aufbringung einer Passivierungsschicht nach Aufbringung der biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente in diskreten Messbereichen (d) wird sich diese Passivierungsschicht im allgemeinen nur in den Bereichen zwischen den Messbereichen (d) befinden. Sofern die genannten lumineszenzmarkierten Moleküle für die orts aufgelöste Referenzierung der verfügbaren Anregungslichtintensität („Referenzierungslabel“) an die „chemisch neutralen“ Verbindungen (siehe unten), aus denen die Passivierungsschicht erzeugt wird, vor deren Aufbringung gebunden sind, werden diese „Referenzierungslabel“ folglich in den Bereichen zwischen den Messbereichen (d) lokalisiert sein. Die „Referenzierungslabel“ können aber auch in einem separaten Schritt auf die Sensorplattform, vor Aufbringung der Passivierungsschicht, aufgebracht werden. In diesem Fall, und insbesondere wenn die „Referenzierungslabel“ als Bestandteil einer Haftvermittlungsschicht oder nach deren Aufbringung, aber vor Aufbringung der biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente auf die Sensorplattform aufgebracht werden, werden sie auch in den Bereichen der diskreten Messbereiche (für den Analytnachweis) lokalisiert sein. – Die Anforderungen an die spektralen Eigenschaften der „Referenzierungslabel“, insbesondere für den letztgenannten Fall, werden weiter unten erläutert.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Kit zum gleichzeitigen qualitativen und / oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten, umfassend

- eine Sensorplattform
- eine auf der Sensorplattform aufgebrachte dünne Schicht (g)
- mindestens ein Array von in diskreten Messbereichen (d) direkt, oder über eine Haftvermittlungsschicht, auf der Schicht (g) immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zur spezifischen Erkennung und / oder Bindung besagter Analyten und / oder spezifischen Wechselwirkung mit besagten Analyten,
- eine Passivierungsschicht aus gegenüber den Analyten "chemisch neutralen" Verbindungen oder einer passivierten Haftvermittlungsschicht mit einer gegenüber den Analyten „chemisch neutralen“ Oberfläche zwischen den Messbereichen,

wobei mit auf der Sensorplattform aufgebrachten Schicht (g) in einer möglichst homogenen Verteilung über die Sensorplattform lumineszenzmarkierte Moleküle assoziiert sind, welche der orts aufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen oder in deren Umgebung verfügbaren Anregungslichtintensität dienen.

Mit der ersten und zweiten Form eines erfindungsgemässen Kits und deren weiteren erfindungsgemässen Ausführungsformen, welche nachfolgend beschrieben werden, kann die beschriebene Problemstellung gelöst werden. Überraschend wurde dabei festgestellt, dass es, unter Verwendung eines erfindungsgemässen Kits, möglich ist, in Multianalyt-Assays, zur gleichzeitigen Bestimmung mehrerer Analyten in einer Probe, eine ähnlich hohe Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit zu erzielen wie bisher in einer entsprechenden Anzahl von Einzelassays zum Nachweis der individuellen Analyten.

Es wird bevorzugt, dass die gegenüber den Analyten "chemisch neutralen" Verbindungen ausgewählt sind aus den Gruppen, die von Albuminen, insbesondere Rinderserumalbumin oder Humanserumalbumin, Casein, unspezifischen, polyklonalen oder monoklonalen, art-fremden oder empirisch für den oder die nachweisenden Analyten unspezifischen Antikörpern (insbesondere für Immunoassays), Detergentien – wie beispielsweise Tween 20 –, nicht mit zu analysierenden Polynukleotiden hybridisierender, fragmentierter natürlicher oder synthetischer DNA, wie beispielsweise ein Extrakt von Herings- oder Lachssperma (insbesondere für Polynukleotid-Hybridisierungsassays), oder auch ungeladenen, aber hydrophilen Polymeren, wie beispielsweise Polyethylenglycole oder Dextrane, gebildet werden.

Innerhalb der mit diesen Verbindungen nach deren Aufbringung auf die Sensorplattform erzeugten Passivierungsschicht können die möglichst homogen darin verteilten lumineszenzmarkierten Moleküle beispielsweise lumineszenzmarkierte Derivate der oben genannten Verbindungen sein, welche mit den entsprechenden unmarkierten Verbindungen vor der Aufbringung auf die Sensorplattform gemischt werden. Dabei kann die Verknüpfung besagter unmarkierter „chemisch neutraler“ Verbindungen mit entsprechenden Lumineszenzlabeln zur Bildung der lumineszenzmarkierten Derivate kovalenter Natur sein oder beispielsweise auf elektrostatischen, ionischen, hydrophoben oder hydrophilen oder van-der-Waals-Wechselwirkungen beruhen. Die Lumineszenzlabel können auch, ohne Erzeugung lumineszenzmarkierter Derivate, mit den besagten „chemisch neutralen“ Verbindungen gemischt werden, bevor diese Mischung zur Erzeugung der Passivierungsschicht auf die Sensorplattform aufgebracht wird. Die „Referenzierungslabel“ können auch in einem separaten Schritt vor Aufbringung der Passivierungsschicht aufgebracht werden. Die Wahl des Anteils von Lumineszenzlabeln in der Passivierungsschicht kann dabei angepasst werden an die Höhe zu erwartender Lumineszenzsignale in einem mit dem erfindungsgemässen Kit auszuführenden Analytnachweisverfahren, um beispielsweise eine Beeinträchtigung der Nachweisempfindlichkeit für einen Analyten, z.B. aufgrund zu starker Lumineszenzsignale aus der Passivierungsschicht, zu vermeiden. Im Falle einer separaten Aufbringung der „Referenzierungslabel“ gelten gleichartige Anforderungen.

Wesentlich ist, dass die Passivierungsschicht unter den Bedingungen eines mit dem erfindungsgemässen Kit auszuführenden Analytnachweises „stabil“ ist, d.h., dass es insbesondere zu keinem messbaren Austreten von Lumineszenzlabeln in eine gegebenenfalls in einem Assay mit der Sensorplattform in Kontakt gebrachte Proben- oder Reagentienflüssigkeit kommt, und dass die Lumineszenzlabel der Passivierungsschicht eine ausreichend hohe thermische und photochemische Stabilität besitzen, so dass es zumindest während der Dauer eines Analytnachweises zu keinem messbaren Signalverlust der erzeugten Signale zur orts aufgelösten Referenzierung kommt.

Weiterhin wird bevorzugt, dass besagte immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente ausgewählt sind aus der Gruppe, die von Nukleinsäuren (beispielsweise DNA, RNA, Oligonukleotiden) und Nukleinsäureanaloge (z. B. PNA), mono- oder polyklonalen Antikörpern, Peptiden, Enzymen, Aptameren, synthetischen Peptidstrukturen, löslichen, membrangebundenen und aus einer Membran isolierten

Proteinen, wie beispielsweise Rezeptoren, deren Liganden, Antigenen für Antikörper, "Histidin-Tag-Komponenten" und deren Komplexbildungspartnern, durch chemische Synthese erzeugten Kavitäten zur Aufnahme molekularer Imprints, etc. gebildet wird. Es ist auch vorgesehen, dass als biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente ganze Zellen, Zellbestandteile, Zellmembranen oder deren Fragmente aufgebracht werden.

Ausserdem wird bevorzugt, dass der Analytnachweis auf der Bestimmung der Änderung einer oder mehrerer Lumineszenzen beruht.

Eine mögliche Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von einer oder mehreren Lichtquellen in einer Auflichtanordnung eingestrahlt wird.

Für zahlreiche Ausführungsformen wird bevorzugt, dass das mit den Messbereichen in Kontakt stehende Material der Sensorplattform innerhalb einer Tiefe von mindestens 200 nm von den Messbereichen bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparent oder absorbierend ist.

Andere Ausführungsformen sind dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von einer oder mehreren Lichtquellen in einer Transmissionslichtanordnung eingestrahlt wird.

Vielfach ist es von Vorteil, wenn das Material der Sensorplattform bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparent ist.

Eine bevorzugte Ausführungsform eines erfindungsgemässen Kits ist dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorplattform als ein optischer Wellenleiter ausgebildet ist, welcher vorzugsweise im wesentlichen planar ist. Dabei umfasst die Sensorplattform vorzugsweise ein Material aus der Gruppe, die von Silikaten, z. B. Glas oder Quarz, transparenten thermoplastischen oder spritzbaren Kunststoff, beispielsweise Polycarbonat, Polyimid, Acrylaten, insbesondere Polymethylmethacrylat, oder Polystyrolen gebildet wird.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform eines erfindungsgemässen Kits ist dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorplattform einen optischen Dünnschichtwellenleiter mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten Schicht (a) auf einer bei min-

destens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) umfasst.

Verschiedene Ausführungsformen derartiger Sensorplattformen und Verfahren zum Nachweis einer oder mehrerer Analyten unter Verwendung solcher Sensorplattformen sind ausführlich beispielsweise in den Patenten US 5,822,472, US 5,959,292 und US 6,078,705 sowie in den Patentanmeldungen WO 96/35940, WO 97/37211, WO 98/08077, WO 99/58963, PCT/EP 00/04869 und PCT/EP 00/07529 beschrieben und sind als integraler Bestandteil eines erfindungsgemässen Kits ebenfalls Bestandteil der vorliegenden Erfindung

Für einen erfindungsgemässen Kit mit einem optischen Wellenleiter als Sensorplattform wird bevorzugt, dass das Anregungslicht von einer oder mehreren Lichtquellen eingekoppelt wird in den optischen Wellenleiter mittels eines Verfahrens, welches ausgewählt ist aus der Gruppe, die von Stirnflächenkopplung, Einkopplung über angebrachte optische Fasern als Lichtleiter, Prismenkopplung, Gitterkopplung oder evaneszenter Kopplung durch Überlappung des evaneszenten Feldes besagten optischen Wellenleiters mit dem evaneszenten Feld eines weiteren, damit in Nahfeldkontakt gebrachten Wellenleiters gebildet wird.

Generell ist es anzustreben, die Erzeugung von Reflexionen eingestrahltten Anregungslichts weitestmöglich zu vermeiden, da diese im allgemeinen im wesentlichen nachteilig zu einer Erhöhung von Hintergrundsignalen führen. Beispielsweise ist mit dem Auftreten von Reflexionen prinzipiell jeweils beim Durchgang des Anregungslichts durch optische Grenzflächen zu Medien mit unterschiedlichen Brechungsindices zu rechnen. Daher ist es von Vorteil, wenn die Einkopplung des Anregungslichts von einer oder mehreren Lichtquellen in den optischen Wellenleiter mittels eines damit in Kontakt stehenden optischen Koppellements erfolgt, welches ausgewählt ist aus der Gruppe von optischen Fasern als Lichtleiter, Prismen, gegebenenfalls über eine brechungsindexanpassende Flüssigkeit, und Gitterkopplern.

Besonders bevorzugt wird eine Ausführungsform des erfindungsgemässen Kits, welche dadurch gekennzeichnet ist, dass das Anregungslicht von einer oder mehreren Lichtquellen in die Schicht (a) mittels einer oder mehrerer in der Schicht (a) modulierten Gitterstrukturen (c) eingekoppelt wird.



Geeignete geometrische Anordnungen solcher Gitterstrukturen für eine Sensorplattform als Teil eines erfindungsgemässen Kits sind wiederum beispielsweise in den Patenten US 5,822,472, US 5,959,292 und US 6,078,705 sowie in den Patentanmeldungen WO 96/35940, WO 97/37211, WO 98/08077, WO 99/58963, PCT/EP 00/04869 und PCT/EP 00/07529 beschrieben und sind als integraler Bestandteil eines erfindungsgemässen Kits ebenfalls Bestandteil der vorliegenden Erfindung.

Für eine Vielzahl von Ausführungsformen wird bevorzugt, dass die Sensorplattform gleichförmige, unmodulierte Bereiche der Schicht (a) umfasst, welche vorzugsweise in Ausbreitungsrichtung des über eine Gitterstruktur (c) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts angeordnet sind.

Generell gilt, dass Gitterstrukturen (c) der Einkopplung von Anregungslicht zu den Messbereichen (d) und / oder der Auskopplung von in die Schicht (a) rückgekoppeltem Lumineszenzlicht dienen können. In genereller Form wird die Sensorplattform daher eine Vielzahl von Gitterstrukturen (c) gleicher oder unterschiedlicher Periode mit gegebenenfalls daran anschliessenden gleichförmigen, unmodulierten Bereichen der Schicht (a) auf einem gemeinsamen, durchgehenden Substrat umfassen.

In den Assay-Applikationen mit einem erfindungsgemässen Kit ist es im allgemeinen vorteilhaft, ein geeignetes Anregungslicht über eine Gitterstruktur (c) einzukoppeln, an welche sich in Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Lichts ein unmodulierter Bereich der Schicht (a) mit einer darauf befindlichen Vielzahl von Messbereichen in einem Array anschliesst, auf denen der Nachweis der verschiedenen Analyten erfolgt. Daran wird sich in der Ausbreitungsrichtung des geführten Lichts vorteilhaft eine weitere Gitterstruktur mit einem dahinter befindlichen weiteren Array von Messbereichen anschliesst etc. Nach Durchlaufen eines unmodulierten Bereichs wird das in der Schicht (a) geführte Licht jeweils wieder ausgekoppelt. In der zur Ausbreitungsrichtung des geführten Lichts senkrechten Richtung (d.h. parallel zu den Gitterlinien) werden sich weitere Arrays von Messbereichen anschliessen. Daher wird bevorzugt, dass jedem in Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts nachfolgenden Array von Messbereichen eine für dieses Array spezifische Gitterstruktur (c) zur Auskopplung dieses Anregungslichts zugeordnet ist, wobei senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts die Gitterstrukturen spezifisch für einzelne Arrays ausgebildet sein können oder sich auch

über die ganze Sensorplattform in dieser Richtung erstrecken können. Dieses bedeutet also, dass das Einkoppelgitter eines in Ausbreitungsrichtung eines in der Schicht (a) einer Sensorplattform geführten Anregungslichts nachfolgenden Arrays als Auskoppelgitter für das am Einkoppelgitter des in besagter Ausbreitungsrichtung vorangehenden Arrays eingekoppelte Anregungslicht dient.

Für bestimmte Anwendungen, beispielsweise für den Einsatz von 2 oder mehr Lumineszenzlabeln mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen, ist es von Vorteil, wenn die Sensorplattform eine Überlagerung von 2 oder mehreren Gitterstrukturen unterschiedlicher Periodizität mit zueinander paralleler oder nicht paralleler, vorzugsweise nicht paralleler Ausrichtung der Gitterlinien umfasst, welche der Einkopplung von Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlänge dient, wobei im Falle von 2 überlagerten Gitterstrukturen deren Gitterlinien vorzugsweise senkrecht zueinander ausgerichtet sind.

Die Unterteilung der Sensorplattform in Bereiche mit darin ausgebildeten Gitterstrukturen und sich darin anschliessenden unmodulierten Bereichen bedeutet für die Anwendung, dass der Platzbedarf für ein einzelnes Array von Messbereichen zwischen aufeinander folgenden Gitterstrukturen (einschliesslich von mindestens einer zugeordneten Gitterstruktur) ein gewisses Minimum nicht unterschreiten kann, welches bei den gegenwärtigen technischen Möglichkeiten zur Erzeugung der Gitterstrukturen sowie zur Einkopplung eines geeigneten Anregungslichtbündels in der Grössenordnung von etwa  $0.1 \text{ mm}^2$  bis  $1 \text{ mm}^2$  liegt. Daher ist es insbesondere für Anordnungen, in denen eine Vielzahl jeweils kleinflächiger Arrays erwünscht ist, von Vorteil, wenn eine Gitterstruktur (c) oder eine Überlagerung mehrerer Gitterstrukturen in der Schicht (a) im wesentlichen über die gesamte Fläche der Sensorplattform moduliert ist.

In einer Weiterentwicklung wird bevorzugt, dass auf der Sensorplattform optisch oder mechanisch erkennbare Markierungen zur Erleichterung der Justierung in einem optischen System und / oder zur Verbindung mit Probenbehältnissen als Teil eines analytischen Systems aufgebracht sind.

Sofern eine Eigenfluoreszenz der Schicht (b) nicht auszuschliessen ist, insbesondere wenn diese aus einem Kunststoff wie beispielsweise Polycarbonat besteht, oder auch um den Einfluss der Oberflächenrauigkeit der Schicht (b) auf die Lichtleitung in der Schicht (a) zu

vermindern, kann es von Vorteil sein, wenn zwischen den Schichten (a) und (b) eine Zwischenschicht aufgebracht ist. Daher besteht eine weitere Ausführungsform der erfindungsgemässen Anordnung darin, dass sich zwischen den optisch transparenten Schichten (a) und (b) und in Kontakt mit Schicht (a) eine weitere optisch transparente Schicht (b') mit niedrigerem Brechungsindex als dem der Schicht (a) und einer Stärke von 5 nm - 10000 nm, vorzugsweise von 10 nm - 1000 nm, befindet.

Die einfachste Form der Immobilisierung der biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente besteht in physikalischer Adsorption, beispielsweise infolge hydrophober Wechselwirkungen zwischen den Erkennungselementen und der Grundplatte. Diese Wechselwirkungen können jedoch durch die Zusammensetzung des Mediums und dessen physikalisch-chemische Eigenschaften, wie beispielsweise Polarität und Ionenstärke, in ihrem Ausmass stark verändert werden. Insbesondere im Falle sequentieller Zugabe verschiedener Reagentien in einem mehrstufigen Assay ist das Haftvermögen der Erkennungselemente nach rein adsorptiver Immobilisierung auf der Oberfläche oft unzureichend. In einer bevorzugten Form des erfindungsgemässen Kits wird das Haftvermögen dadurch verbessert, dass zur Immobilisierung biologischer oder biochemischer oder synthetischer Erkennungselemente auf der Sensorplattform eine Haftvermittlungsschicht (f) aufgebracht ist. Die Haftvermittlungsschicht kann dabei auch, insbesondere im Falle zu immobilisierender biologischer oder biochemischer Erkennungselemente, der Verbesserung der "Biokompatibilität" von deren Umgebung dienen, d.h. der Erhaltung der Bindungsfähigkeit, im Vergleich zu deren natürlicher biologischer oder biochemischer Umgebung, und insbesondere der Vermeidung einer Denaturierung. Es wird bevorzugt, dass die Haftvermittlungsschicht (f) eine Stärke von weniger als 200 nm, vorzugsweise von weniger als 20 nm, hat. Für die Herstellung der Haftvermittlungsschicht eignen sich eine Vielzahl von Materialien. Ohne jegliche Einschränkung wird bevorzugt, dass die Haftvermittlungsschicht (f) eine oder mehrere chemische Verbindungen aus den Gruppen umfasst, die Silane, funktionalisierte Silane, Epoxide, funktionalisierte, geladene oder polare Polymere und "selbstorganisierte passive oder funktionalisierte Mono- oder Mehrfachschichten" umfassen. Die Haftvermittlungsschicht kann zusätzlich mit ihr assoziierte „Referenzierungslabel“ zur orts aufgelösten Referenzierung einer verfügbaren Anregungslichtintensität umfassen, wobei diese „Referenzierungslabel“ zusammen und gegebenenfalls an die

genannten Komponenten der Haftvermittlungsschicht gebunden oder in einem separaten Schritt aufgebracht werden können.

Ein weiterer wesentlicher Aspekt des erfindungsgemässen Kits ist, dass die biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente in räumlich getrennten Messbereichen (d) immobilisiert sind. Diese räumlich getrennten Messbereiche (d) können durch räumlich selektive Aufbringung von biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen auf der Sensorplattform erzeugt werden. Für die Aufbringung eignen sich eine Vielzahl bekannter Verfahren. Ohne Beschränkung der Allgemeinheit wird bevorzugt, dass zur Aufbringung der biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente auf der Sensorplattform eines oder mehrere Verfahren verwendet werden aus der Gruppe von Verfahren, die von "Ink jet spotting", mechanischem Spotting mittels Stift, Feder oder Kapillare, "micro contact printing", fluidischer Kontaktierung der Messbereiche mit den biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen durch deren Zufuhr in parallelen oder gekreuzten Mikrokanälen, unter Einwirkung von Druckunterschieden oder elektrischen oder elektromagnetischen Potentialen" sowie photochemischen und photolithographischen Immobilisierungsverfahren gebildet werden.

Eine weitere spezielle Ausführungsform des erfindungsgemässen Kits besteht darin, dass die Dichte der in diskreten Messbereichen immobilisierten Erkennungselemente zum Nachweis unterschiedlicher Analyten auf unterschiedlichen Messbereichen so ausgewählt ist, dass die Lumineszenzsignale beim Nachweis verschiedener Analyten in einem gemeinsamen Array von gleicher Grössenordnung sind, d.h., dass gegebenenfalls die zugehörigen Kalibrationskurven für die gleichzeitig durchzuführenden Analytbestimmungen ohne eine Änderung der elektronischen oder optoelektronischen Systemeinstellungen aufgenommen werden können.

Eine andere vorteilhafte Variante des erfindungsgemässen Kits ist dadurch gekennzeichnet, dass Arrays von Messbereichen aufgeteilt sind in Segmente von ein oder mehreren Messbereichen zur Bestimmung von Analyten und Bereichen zwischen diesen Messbereichen oder zusätzlichen Messbereichen zu Zwecken einer zusätzlichen physikalischen Referenzierung, wie beispielsweise des Einflusses von Änderungen äusserer Parameter, wie beispielsweise der Temperatur, sowie zu Zwecken der Referenzierung des Einflusses

zusätzlicher physikalisch-chemischer Parameter, wie beispielsweise unspezifischer Bindung an die Sensorplattform von Bestandteilen einer aufgetragenen Probe.

Für bestimmte Anwendungen, in denen beispielsweise Fragen der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit einer Vielzahl von Arrays auf einer gemeinsamen Sensorplattform im Vordergrund stehen, ist es vorteilhaft, dass zwei oder mehr Arrays eine gleichartige geometrische Anordnung von Messbereichen und / oder Segmenten von Messbereichen für die Bestimmung gleichartiger Analyten auf diesen Arrays aufweisen.

Ebenfalls vor allem zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit von Messungen auf verschiedenen Messbereichen kann es vorteilhaft sein, wenn ein oder mehrere Arrays Segmente von zwei oder mehr Messbereichen mit innerhalb des Segments gleichartigen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zur Analytbestimmung oder Referenzierung umfassen.

In anderen Applikationen ist es wesentlich, die Einflüsse systematischer Fehler auf die Ergebnisse zu minimieren, wie sich diese beispielsweise durch eine Replikation gleichartiger Strukturen auf einer gemeinsamen Sensorplattform ergeben können. Beispielsweise hierfür kann es von Vorteil sein, dass zwei oder mehr Arrays eine unterschiedliche geometrische Anordnung von Messbereichen und / oder Segmenten von Messbereichen für die Bestimmung gleichartiger Analyten auf diesen Arrays aufweisen.

Der erfindungsgemäße Kit mit einer Vielzahl von Messbereichen in diskreten Arrays, von denen ihrerseits eine Vielzahl auf einer gemeinsamen Sensorplattform angeordnet sein kann, bietet die Möglichkeit, dass unter Einsatz relativ geringer Mengen von Probelösungen, Reagentien oder gegebenenfalls Kalibrationslösungen auf ein- und derselben Plattform, unter weitestgehend identischen Bedingungen, auch viele Arten von Duplikationen oder Mehrfachausführungen gleichartiger Messungen durchgeführt werden können. Damit können beispielsweise in einer einzigen Messung statistische Daten erzeugt werden, wofür herkömmlicherweise eine Vielzahl von Einzelmessungen mit entsprechend längerer Gesamt-Messzeit und höherem Verbrauch an Proben- und Reagentienmengen erforderlich sind. Es wird bevorzugt, dass für den Nachweis jedes Analyten oder zur Referenzierung jeweils 2 oder mehr identische Messbereiche innerhalb eines Segments oder Arrays vorgesehen sind. Dabei können beispielsweise besagte identische Messbereiche in einer durch-

gehenden Reihe oder Spalte oder Diagonalen eines Arrays oder Segments von Messbereichen angeordnet sein. Die Aspekte der Referenzierung können physikalische oder physikalisch-chemische Parameter der Sensorplattform betreffen, wie beispielsweise lokale Unterschiede der Anregungslichtintensität (siehe hierzu auch weiter unten), als auch Einflüsse der Probe, wie beispielsweise deren pH, Ionenstärke, Brechungsindex, Temperatur etc.

Für andere Applikationen kann es aber auch vorteilhaft sein, wenn besagte identische Messbereiche statistisch innerhalb eines Arrays oder Segments von Messbereichen angeordnet sind.

Der erfindungsgemässe Kit kann eine sehr grosse Anzahl einzelner Messbereiche umfassen. Es wird bevorzugt, dass in einer 2-dimensionalen Anordnung bis zu 100 000 Messbereiche angeordnet sind und ein einzelner Messbereich eine Fläche von  $0.001 - 6 \text{ mm}^2$  einnimmt. Bevorzugt sind auf einer Sensorplattform als Bestandteil des erfindungsgemässen Kits mehr als 100, stärker bevorzugt mehr als 1000, noch mehr bevorzugt mehr als 10 000 Messbereiche angeordnet.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Ausführungsform des erfindungsgemässen Kits, in der die Oberseite der Sensorplattform mit den darauf erzeugten Messbereichen über der optisch transparenten Schicht (a) mit einem weiteren Körper derart zusammengebracht ist, dass zwischen der Sensorplattform als Grundplatte und besagtem Körper eine oder mehrere räumliche Aussparungen zur Erzeugung eines oder mehrerer gegeneinander fluidisch abgedichteter Probenbehältnisse erzeugt werden, in denen jeweils ein oder mehrere Messbereiche oder Segmente oder Arrays von Messbereichen liegen.

Eine dabei bevorzugte Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass die Probenbehältnisse als gegeneinander fluidisch abgedichtete Flusszellen mit jeweils mindestens einem Zulauf und mindestens einem Ablauf ausgebildet sind und gegebenenfalls zusätzlich mindestens ein Ablauf jeder Flusszelle in ein mit dieser Flusszelle fluidisch verbundenes Reservoir führt, welches aus der Flusszelle austretende Flüssigkeit aufnimmt.

Vorteilhafterweise ist dabei das gegebenenfalls zusätzlich vorhandene Reservoir zur Aufnahme aus der Flusszelle austretender Flüssigkeit als eine Vertiefung in der Aussenwand des mit der Sensorplattform als Grundplatte zusammengebrachten Körpers ausgebildet.

Für die Erzeugung der räumlichen Aussparungen zwischen der Sensorplattform als Grundplatte und dem damit zusammengebrachten Körper gibt es dabei verschiedene technische Möglichkeiten. In einer möglichen Anordnung sind auf der Sensorplattform als Grundplatte räumliche Strukturen im Raster des Arrays der zu erzeugenden Flusszellen ausgebildet. Diese Strukturen auf der Grundplatte können beispielsweise die Wände oder Teile der Wände, wie beispielsweise Sockel, zwischen den neben- und hintereinander angeordneten Flusszellen bilden, welche durch Zusammenbringen der Grundplatte mit einem entsprechend geformten Körper erzeugt werden. Um das Array von Flusszellen zu erzeugen, ist es auch möglich, dass zur Erzeugung der räumlichen Aussparungen zwischen der Sensorplattform als Grundplatte und dem damit zusammengebrachten Körper Ausnehmungen in der Sensorplattform ausgebildet sind.

Eine weitere Ausführungsform besteht darin, dass zur Erzeugung der Aussparungen zwischen der Grundplatte und dem damit zusammengebrachten Körper Ausnehmungen in besagtem Körper ausgebildet sind. Für diese Ausführungsform wird bevorzugt, dass die Grundplatte im wesentlichen planar ist.

Der mit der Grundplatte zusammenzubringende Körper zur Erzeugung des Arrays von Flusszellen kann aus einem einzigen Werkstück bestehen. Eine andere Ausführungsform besteht darin, dass der mit der Grundplatte zusammengebrachte Körper aus mehreren Teilen zusammengesetzt ist, wobei die zusammengefügte Bestandteile besagten Körpers vorzugsweise eine irreversibel zusammengefügte Einheit bilden.

Es wird bevorzugt, dass der mit der Grundplatte zusammengebrachte Körper hilfsweise Vorkehrungen umfasst, welche das Zusammenfügen besagten Körpers und der Grundplatte erleichtern.

Die Anordnung umfasst vorzugsweise eine Vielzahl, d. h. 2 – 2000 Probenbehältnissen, bevorzugt 2 – 400, besonders bevorzugt 2 – 100 Probenbehältnissen.

Beispielsweise für Anwendungen, in denen die Zugabe der Proben und / oder zusätzlicher Reagentien direkt durch einen Dispenser erfolgen soll, wird bevorzugt, dass die Probenbehältnisse auf der den Messbereichen gegenüberliegenden Seite des mit der Sensorplattform als Grundplatte zusammengebrachten Körpers offen sind.

Bevorzugt wird, dass das Raster (Aufeinanderfolge in Zeilen und / oder Spalten) der Probenbehältnisse dem Raster der Wells einer Standardmikrotiterplatte entspricht.

Eine weitere Ausführungsform der Anordnung von Probenbehältnissen als Teil des erfindungsgemässen Kits ist dadurch gekennzeichnet, dass sie durch einen zusätzlichen Abschluss, beispielsweise eine Folie, Membran oder eine Deckplatte, abgeschlossen wird.

Durch Variation der Grundflächen und der Tiefe der Ausnehmungen kann die Aufnahme-fähigkeit der Flusszellen in einem weiten Bereich variiert werden, so dass das Innen-volumen jedes Probenbehältnisses typischerweise  $0.1 \mu\text{l} - 1000 \mu\text{l}$ , bevorzugt  $1 \mu\text{l} - 20 \mu\text{l}$  beträgt. Dabei können die Innenvolumina verschiedener Flusszellen einer Anordnung gleich oder unterschiedlich sein.

Es wird bevorzugt, dass die Tiefe der Ausnehmungen zwischen der Sensorplattform als Grundplatte und dem damit zusammengefügteten Körper  $1 - 1000 \mu\text{m}$ , besonders bevorzugt  $20 - 200 \mu\text{m}$  beträgt. Die Grösse der Ausnehmungen eines Arrays kann einheitlich oder unterschiedlich sein und die Grundflächen können beliebige, vorzugsweise rechteck- oder polygonförmige oder auch andere Geometrie haben. Ebenso können die lateralen Abmes-sungen der Grundflächen in einem weiten Bereich variiert werden, wobei typischerweise die Grundflächen der Ausnehmungen zwischen der Grundplatte und dem damit zusammen-gefügteten Körpers jeweils  $0.1 \text{ mm}^2 - 200 \text{ mm}^2$ , bevorzugt  $1 \text{ mm}^2 - 100 \text{ mm}^2$  betragen. Es wird bevorzugt, dass die Ecken der Grundflächen abgerundet sind. Abgerundete Ecken wirken sich günstig auf das Strömungsprofil aus und erleichtern die Entfernung eventuell gebildeter Gasblasen aus den Flusszellen bzw. verhindern deren Entstehen.

Für die gleichzeitige Proben- oder Reagentienzugabe zu einer Vielzahl von Probenbehält-nissen können Multikanalpipettoren für manuelle oder automatische Reagentienapplikation verwendet werden, bei denen die individuellen Pipetten in ein- oder zweidimensionalen Arrays angeordnet sind, sofern die Anordnung von Probenbehältnissen als Teil des erfin-dungsgemässen Kits die Zuläufe in dem entsprechenden Raster aufweist. Bevorzugt ent-spricht daher das Raster (Aufeinanderfolge in Zeilen und Spalten) der Anordnung dem Raster der Wells von Standardmikrotiterplatten. Als industrieller Standard ist dabei eine Anordnung von  $8 \times 12$  Wells mit einem (Zentrum-zu-Zentrum) Abstand von ca.  $9 \text{ mm}$  etabliert. Hiermit kompatibel sind kleinere Arrays mit beispielsweise 3, 6, 12, 24 und 48



Wells in gleichem Abstand. Es können auch mehrere erfindungsgemässe Anordnungen von Probenbehältnissen mit solchen kleineren Arrays von Flusszellen derart zusammengefügt werden, dass die einzelnen Zuläufe besagter Flusszellen in einem ganzzahligen Vielfachen des Abstands von ca. 9 mm angeordnet sind.

Seit einiger Zeit werden auch Platten mit 384 und 1536 Wells, als ganzzahligem Vielfachen von 96 Wells auf gleicher Grundfläche mit entsprechend reduziertem Wellabstand, verwendet, welche ebenfalls als Standardmikrotiterplatten bezeichnet werden sollen. Durch die Anpassung des Rasters der Probenbehältnisse der erfindungsgemässen Anordnung, mit den Zu- und Abläufen jedes Probenbehältnisses, an diese Standards können eine Vielzahl kommerziell eingeführter und erhältlicher Labor-Pipettoren und -Roboter für die Probenzugabe verwendet werden.

Bevorzugt entsprechen die äusseren Grundabmessungen der Anordnung von Probenbehältnissen, als Teil des erfindungsgemässen Kits, den Grundabmessungen dieser Standard-Mikrotiterplatten.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Anordnung von beispielsweise 2 bis 8 Probenbehältnissen als Teil des erfindungsgemässen Kits, mit den vorgängig genannten Eigenschaften, in einer Spalte oder beispielsweise 2 bis 12 Probenbehältnissen in einer Zeile, welche ihrerseits mit einem Träger ("Metaträger") mit den Abmessungen von Standardmikrotiterplatten derart zusammengefügt werden, dass das Raster (Aufeinanderfolge in Zeilen oder Spalten) der Zuläufe der Probenbehältnisse dem Raster der Wells einer Standardmikrotiterplatte entspricht.

Es können auch mehrere solche Spalten oder Zeilen von Probenbehältnissen mit einem einzigen derartigen Metaträger so zusammengefügt werden, dass das Raster (Aufeinanderfolge in Zeilen oder Spalten) der Zuläufe der Flusszellen dem Raster der Wells einer Standardmikrotiterplatte, d. h. einem ganzzahligen Vielfachen von 9 mm (entsprechend 96-Well-Platte) oder von 4.5 mm (entsprechend 384-Well-Platte, siehe oben) oder von 2.25 mm (entsprechend 1536-Well-Platte, siehe oben) entspricht.

Die Anordnung von Probenbehältnissen kann jedoch selbstverständlich auch in einem anderen Raster ausgebildet sein.

Die Materialien für den mit der Sensorplattform als Grundplatte zusammengebrachten Körper und einer gegebenenfalls verwendeten zusätzlichen Deckplatte müssen den Anforderungen für den jeweils geplanten Einsatz der Anordnung genügen. In Abhängigkeit von der spezifischen Applikation betreffen diese Anforderungen chemische und physikalische Beständigkeit, zum Beispiel gegen saure oder basische Medien, Salze, Alkohole oder Detergentien als Bestandteile von wässrigen Lösungen, oder Formamid, Temperaturbeständigkeit (zum Beispiel zwischen  $-30^{\circ}\text{C}$  und  $100^{\circ}\text{C}$ ), möglichst ähnliche thermische Ausdehnungskoeffizienten von Grundplatte und damit zusammengebrachtem Körper, optische Eigenschaften (z. B. Fluoreszenzfreiheit, Reflexionsvermögen), mechanische Bearbeitbarkeit etc. Es wird bevorzugt, dass das Material des mit der Grundplatte zusammengebrachten Körpers sowie eines optionalen zusätzlichen Abschlusses aus derselben Gruppe wie das Material des "Metaträgers" ausgewählt ist. Dabei können die genannten Komponenten (mit der Sensorplattform als Grundplatte zusammengefügt Körper, Deckplatte) jeweils aus einem einheitlichen Material bestehen als auch eine Mischung oder schichtweise oder laterale Zusammenfügung verschiedener Materialien umfassen, wobei die Materialien sich gegenseitig ersetzen können.

Es ist vorgesehen, dass die Vorkehrungen zur orts aufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen oder in deren Umgebung verfügbaren Anregungslichtintensität eine Durchschnittsbildung über mehrere orts aufgelöste Referenzsignale umfassen. Im Falle von nicht statistisch, sondern systematisch variierender Anregungslichtintensitäten in Form eines über bestimmte Entfernungen vorliegenden Gradienten kann es vorteilhaft sein, wenn auf den zu erwartenden Wert der Anregungslichtintensität eines zwischen verschiedenen Bereichen zur orts aufgelösten Referenzierung liegenden Messbereichs interpoliert wird.

Ein weiteres wesentliches Merkmal des erfindungsgemässen Kits betrifft Vorkehrungen, um in Anwesenheit einer oder mehrerer Analyten erfasste Lumineszenzsignale zu kalibrieren. Eine mögliche Ausführungsform besteht darin, dass besagte Vorkehrungen zur Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten erzeugten Lumineszenzen die Zugabe von Kalibrationslösungen mit bekannten Konzentrationen der nachzuweisenden Analyten auf eine vorbestimmte Anzahl von Arrays umfassen. Beispielsweise ist es möglich, dass 8 – 12 Arrays einer Sensorplattform für Kalibrationszwecke vorgesehen sind.

Mit der Vielzahl von Messbereichen auf einer Sensorplattform ermöglicht der erfindungsgemässe Kit eine weitere, bislang nicht beschriebene Möglichkeit der Kalibration. Diese besteht darin, dass es im wesentlichen nicht notwendig ist, eine Vielzahl von Kalibrationslösungen mit unterschiedlichen, bekannten Konzentrationen auf ein oder mehrere Arrays zu geben, sondern in den für Kalibrationszwecke vorgesehenen Messbereichen die zum Analytnachweis eingesetzten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente in bekannter, aber unterschiedlicher lokaler Konzentration zu immobilisieren. Ebenso wie durch Zugabe verschiedener Kalibrationslösungen unterschiedlicher Analytkonzentrationen auf ein Array mit Erkennungselementen in einer einzelnen konstanten Immobilisierungsdichte eine Kalibrationskurve generiert werden kann, ist es prinzipiell möglich, eine solche Standardkurve, welche die Bindungsaktivität und Häufigkeit der Bindungsereignisse zwischen einem Analyten und seinen Nachweiselementen widerspiegelt, durch Zugabe einer einzigen Kalibrationslösung auf ein Array mit Erkennungselementen in einer unterschiedlichen Immobilisierungsdichte zu erzeugen. Wesentlich für die Durchführbarkeit dieser, vereinfachten Art der Kalibration ist, dass das Bindungsverhalten zwischen einem Analyten und seinen Erkennungselementen genau bekannt ist, und dass die Variation, d.h. die Spannbreite zwischen niedrigster und höchster Immobilisierungsdichte in den für einen Analyten vorgesehenen Messbereichen zur Kalibration ausreichend ist, um den gesamten für die Analytdetektion vorgesehenen Arbeitsbereich eines Assays abzudecken.

Daher ist weiterer Gegenstand der Erfindung ein Kit, welcher dadurch gekennzeichnet ist, dass in einem oder mehreren Arrays jeweils mehrere Messbereiche mit dort in einer unterschiedlichen, kontrollierten Dichte immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zum Nachweis eines für diese Messbereiche gemeinsamen Analyten vorgesehen sind. Dabei wird besonders bevorzugt, dass bei bekannter Konzentrationsabhängigkeit der Bindungssignale zwischen einem Analyten und seinen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen und einer ausreichend grossen "Variation" dieser in unterschiedlicher kontrollierter Dichte in verschiedenen Messbereichen eines Arrays immobilisierten Erkennungselemente bereits mittels Zugabe einer einzigen Kalibrationslösung zu diesem Array eine Kalibrationskurve für diesen Analyten erstellt werden kann.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines Kits nach einer der genannten Ausführungsformen in einem analytischen System zur Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein analytisches System mit einer beliebigen Ausführungsform des erfindungsgemässen Kits, dadurch gekennzeichnet, dass es zusätzlich mindestens einen Detektor zur Erfassung einer oder mehrerer Lumineszenzen von der Gitter-Wellenleiter-Struktur umfasst.

Inbesondere Gegenstand der Erfindung ist ein analytisches System zur Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen, mit

- mindestens einer Anregungslichtquelle
- einem erfindungsgemässen Kit sowie
- mindestens einem Detektor zur Erfassung des von einem oder mehreren

Messbereichen (d) auf der Sensorplattform ausgehenden Lichts.

Eine mögliche Ausführungsform des analytisches System ist dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht in einer Auflicht- oder Transmissionslichtanordnung zu den Messbereichen eingestrahlt wird.

Es wird bevorzugt, dass die Detektion des Lumineszenzlichts derart erfolgt, dass das von einer Gitterstruktur (c) oder (c') ausgekoppelte Lumineszenzlicht vom Detektor mit erfasst wird.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemässen analytischen Systems ist dadurch gekennzeichnet, dass das von der mindestens einen Anregungslichtquelle ausgesandte Anregungslicht im wesentlichen parallel ist und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) eingestrahlt wird.

Eine Möglichkeit besteht darin, dass das Anregungslicht von mindestens einer Lichtquelle mit einer Aufweitungsoptik zu einem im wesentlichen parallelen Strahlenbündel aufgeweitet wird und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf eine grossflächige in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) eingestrahlt wird.

Eine Vielzahl weiterer geeigneter analytischer Systeme mit einem erfindungsgemässen Kit als deren Bestandteil sind beispielsweise in den Patenten US 5,822,472, US 5,959,292 und US 6,078,705 sowie in den Patentanmeldungen WO 96/35940, WO 97/37211, WO 98/08077, WO 99/58963, PCT/EP 00/04869 und PCT/EP 00/07529 beschrieben und in Ausführungsformen mit einem erfindungsgemässen Kit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Es wird weiterhin bevorzugt, dass das erfindungsgemässe analytische System zusätzlich Zuführungsmittel umfasst, um die eine oder mehrere Proben mit den Messbereichen auf der Sensorplattform in Kontakt zu bringen.

Eine Weiterentwicklung des analytischen Systems ist dadurch gekennzeichnet, dass Behälter für Reagentien vorgesehen sind, welche während des Verfahrens zum Nachweis des einen oder mehrerer Analyten benetzt und mit den Messbereichen in Kontakt gebracht werden

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum gleichzeitigen qualitativen und / oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten mit einem Kit nach einer der genannten Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass zur orts aufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen (d) auf der Sensorplattform, als Bestandteil des Kits, oder in der Umgebung dieser Messbereiche verfügbaren Anregungslichtintensität die Lumineszenzsignale von möglichst homogen über die Sensorplattform verteilten lumineszenzmarkierten Molekülen, welche mit einer auf besagter Sensorplattform aufgetragenen Passivierungsschicht oder passivierten Haftvermittlungsschicht, zur Minimierung unspezifischer Bindung zwischen den Messbereichen, assoziiert sind, bestimmt werden.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren zum gleichzeitigen qualitativen und / oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten mit einem Kit nach einer der genannten Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass zur orts aufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen (d) auf der Sensorplattform, als Bestandteil des Kits, oder in der Umgebung dieser Messbereiche verfügbaren Anregungslichtintensität die Lumineszenzsignale von möglichst homogen über die Sensorplattform verteilten lumineszenzmarkierten Molekülen, welche mit einer auf besagter Sensorplattform aufgetragenen dünnen Schicht (g) assoziiert sind, bestimmt werden.

Dabei kann der quantitative und / oder qualitative Nachweis besagter Vielzahl von Analyten die Verwendung einer oder mehrerer signalgebender Komponenten als Label umfassen, welche ausgewählt sein können aus der Gruppe, die von beispielsweise Lumineszenzlabeln, insbesondere lumineszenten Interkalatoren oder "molecular beacons", Absorptionslabeln, Massenlabeln, insbesondere Metallkolloiden oder Plastikbeads, Spin-Labeln, wie ESR- oder NMR-Labeln, radioaktiven Labeln gebildet wird.

Im Rahmen des erfindungsgemässen Verfahrens ist es möglich, dass die ortal aufgelöste Referenzierung des in der Umgebung der Messbereiche verfügbaren Anregungslichts und / oder ein gegebenenfalls auf Absorptions- und / oder Lumineszenznachweis beruhender Analytnachweis auf Einsatz von Labels mit gleicher oder unterschiedlicher Absorptions- und / oder Lumineszenzwellenlänge beruhen.

Es wird bevorzugt, dass der Analytnachweis auf der Bestimmung der Änderung einer oder mehrerer Lumineszenzen beruht. Dabei ist es vorteilhaft, wenn die möglichst homogen in der Passivierungsschicht verteilten lumineszenzmarkierten Moleküle („Referenzierungslabel“) und zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten eingesetzte Lumineszenzlabel („Nachweislabel“) bei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt werden können und vorzugsweise auch bei unterschiedlichen Wellenlängen emittieren. Besonders bevorzugt wird, wenn die Absorptions- und Lumineszenzspektren der verwendeten „Referenzierungslabel“ und „Nachweislabel“ möglichst wenig, im Idealfall gar nicht überlappen.

Eine andere bevorzugte Ausführungsform für bestimmte Anwendungen ist dadurch gekennzeichnet, dass die „Referenzierungslabel“ und „Nachweislabel“ bei der gleichen Wellenlänge angeregt werden können, aber bei unterschiedlichen Wellenlängen emittieren.

Eine mögliche Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von einer oder mehreren Lichtquellen in einer Auflichtanordnung eingestrahlt wird.

Andere Ausführungsformen sind dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von einer oder mehreren Lichtquellen in einer Transmissionslichtanordnung eingestrahlt wird.

Ein bevorzugter Gegenstand der Erfindung ist eine Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens, welche dadurch gekennzeichnet ist, dass die Sensorplattform als ein

optischer Wellenleiter ausgebildet ist, welcher vorzugsweise im wesentlichen planar ist, und dass das Anregungslicht von einer oder mehrerer Lichtquellen eingekoppelt wird in den optischen Wellenleiter mittels eines Verfahrens, welches ausgewählt ist aus der Gruppe, die von Stirnflächenkopplung, Einkopplung über angebrachte optische Fasern als Lichtleiter, Prismenkopplung, Gitterkopplung oder evaneszenter Kopplung durch Überlappung des evaneszenten Feldes besagten optischen Wellenleiters mit dem evaneszenten Feld eines weiteren, damit in Nahfeldkontakt gebrachten Wellenleiters gebildet wird.

Bevorzugt wird dabei, dass die Einkopplung des Anregungslichts von einer oder mehreren Lichtquellen in den optischen Wellenleiter mittels eines damit in Kontakt stehenden optischen Koppellements erfolgt, welches ausgewählt ist aus der Gruppe von optischen Fasern als Lichtleiter, Prismen, gegebenenfalls über eine brechungsindexanpassende Flüssigkeit, und Gitterkopplern.

Besonders bevorzugt wird eine solche Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens, welche dadurch gekennzeichnet ist, dass die Sensorplattform einen optischen Dünnschichtwellenleiter mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) umfasst und dass das Anregungslicht von einer oder mehreren Lichtquellen in die Schicht (a) mittels einer oder mehrerer in der Schicht (a) modulierten Gitterstrukturen (c) eingekoppelt wird.

Diese Ausführungsform des Verfahrens kann derart durchgeführt werden, dass eine oder mehrere auf besagte Analyten zu untersuchende flüssige Proben mit den Messbereichen auf der Sensorplattform in Kontakt gebracht werden, eine oder mehrere im Nahfeld der Schicht (a) erzeugte Lumineszenzen aus den mit besagter Probe oder besagten Proben in Kontakt gebrachten Messbereichen, als Folge der Bindung eines oder mehrerer Analyten an die in besagten Messbereichen immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente oder der Wechselwirkung zwischen besagten Analyten und besagten immobilisierten Erkennungselementen, gemessen werden und gegebenenfalls zusätzlich in orts aufgelöster Weise die in besagten Messbereichen oder in deren Umgebung verfügbare Anregungslichtintensität referenziert wird.

Es wird bevorzugt, dass (1) die isotrop abgestrahlte Lumineszenz oder (2) in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelte und über Gitterstrukturen (c) ausgekoppelte Lumineszenz oder Lumineszenzen beider Anteile (1) und (2) gleichzeitig gemessen werden.

Bestandteil des erfindungsgemässen Verfahrens ist, dass zur Erzeugung der Lumineszenzen der „Referenzierungslabel“ und der „Nachweislabel“ Lumineszenzfarbstoffe oder lumineszente Nanopartikel als Lumineszenzlabel verwendet werden, die bei einer Wellenlänge zwischen 300 nm und 1100 nm angeregt werden können und emittieren.

Es wird bevorzugt, dass das „Nachweislabel“ an den Analyten oder in einem kompetitiven Assay an einen Analogen des Analyten oder in einem mehrstufigen Assay an einen der Bindungspartner der immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente oder an die biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente gebunden ist.

Eine andere Ausführungsform des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass ein zweites oder noch weitere „Nachweislabel“ mit gleicher oder unterschiedlicher Anregungswellenlänge wie das erste „Nachweislabel“ und gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden.

Dabei wird bevorzugt, dass das zweite oder noch weitere „Nachweislabel“ bei der gleichen Wellenlänge wie der erste Lumineszenzfarbstoff angeregt werden kann, aber bei anderen Wellenlängen emittieren.

Insbesondere ist von Vorteil, wenn die Anregungsspektren und Emissionsspektren der zum Analytnachweis eingesetzten Lumineszenzfarbstoffe nur wenig oder gar nicht überlappen.

Eine Variante des Verfahrens besteht darin, dass zum Nachweis des Analyten Ladungs- oder optischer Energietransfer von einem als Donor dienenden ersten Lumineszenzfarbstoff zu einem als Akzeptor dienenden zweiten Lumineszenzfarbstoff verwendet wird.

Eine andere mögliche Ausführungsform des Verfahrens besteht darin, dass das Ausmass der Löschung („Quenching“) einer oder mehrerer Lumineszenzen bestimmt wird.



Eine weitere Ausführungsform des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass neben der Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen Änderungen des effektiven Brechungsindex auf den Messbereichen bestimmt werden.

Eine Weiterentwicklung des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die einen oder mehreren Lumineszenzen und / oder Bestimmungen von Lichtsignalen bei der Anregungswellenlänge polarisationsselektiv vorgenommen werden.

Es wird bevorzugt, dass die einen oder mehreren Lumineszenzen bei einer anderen Polarisation als der des Anregungslichts gemessen werden.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die Dichte der in diskreten Messbereichen immobilisierten Erkennungselemente zum Nachweis unterschiedlicher Analyten auf unterschiedlichen Messbereichen so ausgewählt ist, dass die Lumineszenzsignale beim Nachweis verschiedener Analyten in einem gemeinsamen Array von gleicher Grössenordnung sind, d.h., dass die zugehörigen Kalibrationskurven für die gleichzeitig durchzuführenden Analytbestimmungen ohne eine Änderung der elektronischen oder optoelektronischen Systemeinstellungen aufgenommen werden können.

Eine Weiterentwicklung des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass Arrays von Messbereichen aufgeteilt sind in Segmente von ein oder mehreren Messbereichen zur Bestimmung von Analyten und Bereichen zwischen diesen Messbereichen oder zusätzlichen Messbereichen zu Zwecken einer zusätzlichen physikalischen Referenzierung, wie des Einflusses von Änderungen äusserer Parameter, wie beispielsweise der Temperatur, sowie zu Zwecken der Referenzierung des Einflusses zusätzlicher physikalisch-chemischer Parameter, wie beispielsweise unspezifischer Bindung an die Sensorplattform von Bestandteilen einer aufgebrachten Probe. Unspezifische bindende Bestandteile einer aufgebrachten Probe können dabei beispielsweise die einen oder mehreren Analyten selbst, zum Analytnachweis zur Probe hinzugefügte Nachweisreagentien, z.B. sekundäre, lumineszenzmarkierte Antikörper in einem Sandwich-Immunoassay, oder auch Bestandteile der Probenmatrix sein, insbesondere wenn es sich bei dem Probenmedium beispielsweise um eine Körperflüssigkeit handelt und die Probe keinen weiteren Reinigungsschritten unterzogen wurde. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung können die dafür vorgesehenen Bereiche auf einer Sensorplattform

beispielsweise „passiviert worden“ sein, d.h. mit einer gegenüber dem Analyten „chemisch neutralen“ Verbindung beschichtet sein, wie vorangehend beschrieben als Massnahme zur Herabsetzung unspezifischer Bindung. Hierfür bietet das erfindungsgemässe Verfahren den besonderen Vorteil, dass für diese Form der physikalisch-chemischen Referenzierung keine Bereitstellung zusätzlicher Messbereiche erforderlich ist, sondern diese Form der Referenzierung direkt basierend auf den mit der Passivierungsschicht zwischen den Messbereichen (zum Analytnachweis) erzeugten Lumineszenzsignalen erfolgen kann. Im Falle gleicher oder stark überlappender Absorptions- und Emissionsspektren von „Referenzierungslabeln“ und „Nachweislabeln“ erfolgen die orts aufgelöste Bestimmung der verfügbaren Anregungslichtintensität (vor Durchführung des Analytnachweises) und der Analytnachweis (aufgrund der resultierenden Lumineszenzintensitäten der eingesetzten „Nachweislabel“) vorzugsweise sequentiell. Im Falle wenig oder im Idealfall gar nicht überlappender Absorptions- und Emissionsspektren können die entsprechenden Lumineszenzintensitäten der verschiedenen Label auch im wesentlichen gleichzeitig (d.h. ohne zwischenzeitliche Assay-Arbeitsschritte wie Probenzugabe etc., lediglich unter Verwendung der entsprechenden unterschiedlichen Lichtquellen und / oder Anregungs- und Emissions-Filtersätze) bestimmt werden.

Für bestimmte Anwendungen, beispielsweise beim Nachweis niedermolekularer Verbindungen in der Immunoanalytik oder beim Nachweis von Einzelpunktmutationen in der Nukleinsäureanalytik, ist eine Kreuzreaktivität zu den (bio)chemisch ähnlichsten Verwandten des betreffenden Analyten kaum auszuschliessen. Für derartige Anwendungen ist eine solche Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens vorteilhaft, in der ein oder mehrere Messbereiche eines Segments oder eines Arrays der Bestimmung desselben Analyten zugeordnet sind und deren immobilisierte biologische oder biochemische Erkennungselemente unterschiedlich hohe Affinitäten zu besagtem Analyten aufweisen. Die Erkennungselemente sind dabei zweckmässigerweise so ausgewählt, dass sich ihre Affinitäten zu verschiedenen, einander (bio)chemisch ähnlichen Analyten in unterschiedlicher, charakteristischer Weise ändern. Aus der Gesamtheit der Signale von verschiedenen Messbereichen mit unterschiedlichen Erkennungselementen für einen einzelnen Analyten lässt sich dann, in vergleichbarer Weise zu einem Fingerabdruck, die Identität des Analyten bestimmen.

Für andere spezifische Anwendungen, in denen beispielsweise Fragen der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit einer Vielzahl von Arrays auf einer gemeinsamen Sensorplattform

im Vordergrund stehen, ist es vorteilhaft, dass zwei oder mehr Arrays eine gleichartige geometrische Anordnung von Messbereichen und / oder Segmenten von Messbereichen für die Bestimmung gleichartiger Analyten auf diesen Arrays aufweisen.

Ebenfalls vor allem zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit von Messungen auf verschiedenen Messbereichen kann es vorteilhaft sein, wenn ein oder mehrere Arrays Segmente von zwei oder mehr Messbereichen mit innerhalb des Segments gleichartigen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zur Analytbestimmung oder Referenzierung umfassen.

In anderen Applikationen ist es wesentlich, die Einflüsse systematischer Fehler auf die Ergebnisse zu minimieren, wie sich diese beispielsweise durch eine Replikation gleichartiger Strukturen auf einer gemeinsamen Sensorplattform ergeben können. Beispielsweise hierfür kann es von Vorteil sein, dass zwei oder mehr Arrays eine unterschiedliche geometrische Anordnung von Messbereichen und / oder Segmenten von Messbereichen für die Bestimmung gleichartiger Analyten auf diesen Arrays aufweisen.

Das erfindungsgemässe Verfahren mit einem erfindungsgemäsem Kit mit einer Vielzahl von Messbereichen in diskreten Arrays, von denen ihrerseits eine Vielzahl auf einer gemeinsamen Sensorplattform angeordnet sein kann, bietet die Möglichkeit, dass unter Einsatz relativ geringer Mengen von Probelösungen, Reagentien oder Kalibrationslösungen auf ein- und derselben Plattform, unter weitestgehend identischen Bedingungen, auch viele Arten von Duplikationen oder Mehrfachausführungen gleichartiger Messungen durchgeführt werden können. Damit können beispielsweise in einer einzigen Messung statistische Daten erzeugt werden, wofür herkömmlicherweise eine Vielzahl von Einzelmessungen mit entsprechend längerer Gesamt-Messzeit und höherem Verbrauch an Proben- und Reagentienmengen erforderlich sind. Es wird bevorzugt, dass für den Nachweis jedes Analyten oder zur Referenzierung jeweils 2 oder mehr identische Messbereiche innerhalb eines Segments oder Arrays vorgesehen sind. Dabei können beispielsweise besagte identische Messbereiche in einer durchgehenden Reihe oder Spalte oder Diagonalen eines Arrays oder Segments von Messbereichen angeordnet sein. Die Aspekte der Referenzierung können physikalische oder physikalisch-chemische Parameter der Sensorplattform betreffen, wie beispielsweise lokale Unterschiede der Anregungslichtintensität (siehe hierzu auch weiter unten), als auch

Einflüsse der Probe, wie beispielsweise deren pH, Ionenstärke, Brechungsindex, Temperatur etc.

Für andere Applikationen kann es aber auch vorteilhaft sein, wenn besagte identische Messbereiche statistisch innerhalb eines Arrays oder Segments von Messbereichen angeordnet sind.

Weiterhin wird bevorzugt, dass die orts aufgelöste Referenzierung der in den Messbereichen oder in deren Umgebung verfügbaren Anregungslichtintensität eine Durchschnittsbildung über mehrere orts aufgelöste Referenzsignale umfasst. Im Falle von nicht statistisch, sondern systematisch variierender Anregungslichtintensitäten in Form eines über bestimmte Entfernungen vorliegenden Gradienten kann es vorteilhaft sein, wenn auf den zu erwartenden Wert der Anregungslichtintensität eines zwischen verschiedenen Bereichen zur orts aufgelösten Referenzierung liegenden Messbereichs interpoliert wird.

Die Zugabe der einen oder mehreren Proben und der im Nachweisverfahren einzusetzenden Nachweisreagentien kann sequentiell in mehreren Schritten erfolgen. Es wird bevorzugt, dass die eine oder mehreren Proben mit einer Mischung aus den verschiedenen Nachweisreagentien zur Bestimmung der in besagten Proben nachzuweisenden Analyten vorinkubiert werden und diese Mischungen dann in einem einzigen Zugabeschritt den dafür vorgesehenen Arrays auf der Sensorplattform zugeführt werden.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens zeichnet sich dadurch aus, dass die Konzentration der Nachweisreagentien, wie beispielsweise sekundärer Nachweisantikörper und / oder Lumineszenzlabel und optional zusätzlicher lumineszenzmarkierter Nachweisreagentien in einem Sandwich-Immunoassay, so ausgewählt ist, dass die Lumineszenzsignale beim Nachweis verschiedener Analyten in einem gemeinsamen Array von gleicher Grössenordnung sind, d.h., dass die zugehörigen Kalibrationskurven für die gleichzeitig durchzuführenden Analytbestimmungen ohne eine Änderung der elektronischen oder optoelektronischen Systemeinstellungen aufgenommen werden können.

Weiterer Gegenstand einer erfindungsgemässen Ausführungsform des Verfahrens ist, dass die Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten erzeugten Lumineszenzen

die Zugabe von einer oder mehreren Kalibrationslösungen mit bekannten Konzentrationen besagter zu bestimmender Analyten auf die gleichen oder andere Messbereiche oder Segmente von Messbereichen oder Arrays von Messbereichen auf einer Sensorplattform umfasst, denen im gleichen oder einem separaten Zugabeschritt die eine oder die mehreren zu untersuchenden Proben zugeführt werden.

Eine andere bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten erzeugten Lumineszenzen den Vergleich der Lumineszenzintensitäten nach Zugabe einer unbekannten und einer Kontroll-Probe, wie beispielsweise einer "wild type"-DNA-Probe und einer "mutant DNA"-Probe, umfasst. Es ist dabei möglich, dass die Zugabe der unbekannten Probe und der Kontrollprobe zu unterschiedlichen Arrays erfolgt.

Eine andere Variante dieses Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die Zugabe der unbekannten Probe und der Kontrollprobe sequentiell zu dem gleichen Array erfolgt. Bei dieser Ausführungsform ist im allgemeinen zwischen der Zugabe der unbekannten Probe und der Kontrollprobe ein Regenerierungsschritt notwendig, d.h. die Dissoziation von nach Zugabe der ersten Probe gebildeten Erkennungselement-Analyt-Komplexen, gefolgt von der Entfernung der dissoziierten Analytmoleküle aus den Probenbehältnissen, bevor die Zugabe der zweiten Probe erfolgen kann. In ähnlicher Weise können in sequentieller Form auch mehrere Proben auf demselben Array von Messbereichen auf ihre Analyten untersucht werden.

Eine andere mögliche Ausführungsform des Verfahrens besteht darin, dass die unbekannte Probe und die Kontrollprobe gemischt werden und dann die Mischung einem oder mehreren Arrays einer Sensorplattform zugeführt wird.

Eine Weiterentwicklung des erfindungsgemässen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion der in der unbekannten und der Kontrollprobe nachzuweisenden Analyten mittels Lumineszenzlabels von unterschiedlicher Anregungs- und / oder Lumineszenzwellenlänge für die unbekannte und die Kontrollprobe erfolgt.

Beispielsweise wird bevorzugt, dass zur Bestimmung von Analyten aus verschiedenen Gruppen der Nachweis unter Verwendung von zwei oder mehr Lumineszenzlabeln mit unterschiedlichen Anregungs- und / oder Lumineszenzwellenlängen erfolgt.

Wie vorangehend beschrieben, eröffnet der erfindungsgemässe Kit mit der grossen Anzahl von Messbereichen auf einer Sensorplattform die Möglichkeit einer vereinfachten Form der Kalibration zur qualitativen und / oder quantitativen Bestimmung eines oder mehrere Analyten auf einem oder mehreren Arrays. Im besten Fall ist bei dieser neuen, erfindungsgemässen Form der Kalibration der Signale einer Sensorplattform die Zugabe nur einer einzigen Kalibrationslösung erforderlich. In dieser Weiterentwicklung des erfindungsgemässen Verfahrens wird daher bevorzugt, dass in einem oder mehreren Arrays jeweils mehrere Messbereiche mit dort in einer unterschiedlichen, kontrollierten Dichte immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zum Nachweis eines für diese Messbereiche gemeinsamen Analyten vorgesehen sind. Diese Weiterentwicklung des Verfahrens zeichnet sich dadurch aus, dass bei bekannter Konzentrationsabhängigkeit der Bindungssignale zwischen einem Analyten und seinen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen und einer ausreichend grossen "Variation" dieser in unterschiedlicher kontrollierter Dichte in verschiedenen Messbereichen eines Arrays immobilisierten Erkennungselemente bereits mittels Zugabe einer einzigen Kalibrationslösung zu diesem Array eine Kalibrationskurve für diesen Analyten erstellt werden kann.

Bestandteil der Erfindung ist ein Verfahren nach einer der vorgenannten Ausführungsformen zur gleichzeitigen oder sequentiellen, quantitativen oder qualitativen Bestimmung eines oder mehrerer Analyten aus der Gruppe von Antikörpern oder Antigenen, Rezeptoren oder Liganden, Chelatoren oder "Histidin-tag-Komponenten", Oligonukleotiden, DNA- oder RNA-Strängen, DNA- oder RNA-Analoga, Enzymen, Enzymcofaktoren oder Inhibitoren, Lektinen und Kohlehydraten.

Mögliche Ausführungsformen des Verfahrens sind auch dadurch gekennzeichnet, dass die zu untersuchenden Proben natürlich vorkommende Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Lymphe oder Urin oder Eigelb oder optisch trübe Flüssigkeiten oder Gewebeflüssigkeiten oder Oberflächenwasser oder Boden- oder Pflanzenextrakte oder Bio- oder

Syntheseprozessbrühen oder aus biologischen Gewebeteilen oder aus Zellkulturen oder – extrakten entnommen sind.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemässen Kits und / oder eines erfindungsgemässen analytischen Systems und / oder eines erfindungsgemässen Verfahrens für quantitative oder qualitative Analysen zur Bestimmung chemischer, biochemischer oder biologischer Analyten in Screeningverfahren in der Pharmaforschung, der Kombinatorischen Chemie, der Klinischen und Präklinischen Entwicklung, zu Echtzeitbindungsstudien und zur Bestimmung kinetischer Parameter im Affinitätsscreening und in der Forschung, zu qualitativen und quantitativen Analytbestimmungen, insbesondere für die DNA- und RNA-Analytik, für die Erstellung von Toxizitätsstudien sowie für die Bestimmung von Gen- oder Protein-Expressionsprofilen sowie zum Nachweis von Antikörpern, Antigenen, Pathogenen oder Bakterien in der pharmazeutischen Produktentwicklung und -forschung, der Human- und Veterinärdiagnostik, der Agrochemischen Produktentwicklung und -forschung, der symptomatischen und präsymptomatischen Pflanzendiagnostik, zur Patientenstratifikation in der pharmazeutischen Produktentwicklung und für die therapeutische Medikamentenauswahl, zum Nachweis von Pathogenen, Schadstoffen und Erregern, insbesondere von Salmonellen, Prionen, Viren und Bakterien, in der Lebensmittel- und Umweltanalytik.

Die nachfolgenden Ausführungsbeispiele erläutern die Erfindung beispielhaft.

**Beispiel 1:****1A: Sensorplattform**

Es wird eine Sensorplattform mit den äusseren Abmessungen 57 mm Breite (parallel zu den Gitterlinien einer in der Schicht (a) der Sensorplattform modulierten Gitterstruktur (c)) x 14 mm Länge (senkrecht zu den Gitterstrukturen) x 0.7 mm Dicke verwendet, auf deren Fläche durch Kombination mit einer Platte aus Polycarbonat mit in Richtung der Sensorplattform offenen Ausnehmungen mit den Innendimensionen 5 mm Breite x 7 mm Länge x 0.15 mm Höhe 6 Mikrofluszellen im Raster einer Teilspalte einer klassischen Mikrotiterplatte (Raster 9 mm) erzeugt werden können. Die Polycarbonat-Platte kann mit der Sensorplattform derart verklebt werden, dass danach die Ausnehmungen gegeneinander dicht verschliessend abgedichtet sind. Diese Polycarbonat-Platte ist derart konstruiert, dass sie mit einem Träger ("Metaträger") mit den Grundabmessungen von Standardmikrotiterplatten derart zusammengefügt werden kann, dass das Raster (Aufeinanderfolge in Zeilen oder Spalten) der Zuläufe der Flusszellen dem Raster der Wells einer Standardmikrotiterplatte entspricht.

Das Substratmaterial (optisch transparente Schicht (b) besteht aus AF 45 Glas (Brechungsindex  $n = 1.52$  bei 633 nm). Im Substrat ist ein Paar von Ein- und Auskoppelgittern mit parallel zur Breite der Sensorplattform verlaufenden Gitterlinien (318 nm Periode) von  $12 \pm 3$  nm Gittertiefe ausgeprägt, wobei die Gitterlinien über die gesamte Breite der Sensorplattform ausgeprägt sind. Der Abstand zwischen den beiden aufeinanderfolgenden Gittern beträgt 9 mm, die Länge der einzelnen Gitterstrukturen (parallel zur Länge der Sensorplattform) 0.5 mm. Der Abstand zwischen dem Ein- und Auskoppelgitter eines Gitterpaares ist so gewählt, dass die Einkopplung des Anregungslichts jeweils innerhalb des Bereichs der Probenbehältnisse, nach Kombination der Sensorplattform mit der oben beschriebenen Polycarbonatplatte, erfolgen kann, während die Auskopplung ausserhalb des Bereichs der Probenbehältnisse erfolgt. Die wellenleitende, optisch transparente Schicht (a) aus  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  auf der optisch transparenten Schicht (b) hat einen Brechungsindex von 2.15 bei 633 nm (Schichtdicke 150 nm).

Die von der Sensorplattform und der damit kombinierten Polycarbonatplatte gebildeten Probenbehältnisse weisen auf den der Sensorplattform gegenüberliegenden Begrenzungs-



flächen konisch ausgebohrte Öffnungen auf, so dass eine Befüllung oder Entleerung der Probenbehälter durch Einpressen von standardisierten, kommerziell erhältlichen Pipettenspitzen aus Polypropylen erfolgen kann.

Zur Vorbereitung auf die Immobilisierung der biochemischen oder biologischen oder synthetischen Erkennungselemente wird die Sensorplattformen mit Chloroform im Ultraschallgerät gereinigt und mit Poly-L-Lysin, entsprechend bekannten Standardprotokollen, chemisch aktiviert (Schritt 1).

Im nächsten Schritt (Schritt 2) wird, als Lumineszenzlabel für die spätere orts aufgelöste Referenzierung, monofunktionaler Fluoreszenzfarbstoff (FluorX™ (10 nM in 10 mM Carbonatpuffer, pH 9.2) 2 Stunden lang mit der aktivierten Oberfläche der Sensorplattform inkubiert. Der FluorX™ Farbstoff ist der NHS-Ester von Carboxyfluorescein, mit einem erweiterten Linkerarm, und bindet unter milden Bedingungen an die primären Aminogruppen des Poly-L-Lysins. Anschliessend wird mit destilliertem Wasser gewaschen und die Oberfläche durch Zentrifugation getrocknet.

Erzeugung diskreter Messbereiche (Schritt 3): Als biologische Erkennungselemente werden cDNA's in einer Konzentration von 0.1 µg/µl in 10 mM Carbonatpuffer (pH 9.2) auf die Poly-L-Lysin-Oberfläche mit einem kommerziellen Spotter aufgebracht (GMS 417 Arrayer, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) und über Nacht inkubiert (Array von 10 x 10 Spots; Spotdurchmesser 100 µm, Zentrum-zu-Zentrum Abstand 375 µm). Anschliessend wird mit destilliertem Wasser gewaschen und die Oberfläche durch Zentrifugation getrocknet. Die Bindung der cDNA's an die Poly-L-Lysin-Oberfläche ist adsorptiver Natur bzw. erfolgt über elektrostatische Wechselwirkungen. Eine Beeinträchtigung der Bindungskapazität der Oberfläche für cDNA, infolge der zuvor aufgetragenen Fluorophore für die orts aufgelöste Referenzierung, wird nicht festgestellt.

Passivierung der Oberfläche (Schritt 4): Zur weitestgehenden Unterbindung von unspezifischen Wechselwirkungen mit den nachzuweisenden Analyten oder anderer Bestandteile einer aufzubringenden Probe, d.h. zur Erzeugung einer gegenüber den Analyten ausserhalb der Messbereiche „chemisch neutralen“ Oberfläche, wird die Oberfläche nach einem Standardverfahren (M. Schena, „DNA Microarrays - A Practical Approach“, Oxford

University Press, New York, (1999) 131) mit Natriumborhydrat reduziert. Dieses Passivierungs- bzw. Deaktivierungsverfahren ist auch anwendbar für Gaftvermittlungsschichten mit funktionalisierten Silanen, z. B. Reaktiven Aldehyd- oder Epoxygruppen. Die Oberfläche kann zusätzlich durch Aufgabe einer weiteren Passivierungsschicht, zur Minimierung unspezifischer Bindung, weiter passiviert werden, wie in der ausführlichen Beschreibung der Erfindung erläutert.

Auf die so vorbereitete Sensorplattform wird die beschriebene Polycarbonatplatte so aufgebracht, dass die einzelnen Probenbehälter gegeneinander fluidisch dicht verschliessend abgeschlossen sind und das erzeugte cDNA-Array mit dem zugehörigen Einkoppelgittern (c) sich innerhalb eines der 6 Probenbehälter befindet.

### **1B: Hybridisierung mit Cy5-markierter cDNA**

Für die Untersuchung der Genexpression wird die vollständige Poly A<sup>+</sup>-RNA aus Gewebe isoliert (d.h. eine Vielzahl unterschiedlicher RNA-Stränge unbekannter Sequenz und Konzentration), und mittels Reverser Transkriptase und oligo dT Primern mit Cy5-dUTP wird Cy5-markierte cDNA (d.h. eine entsprechende Vielzahl unterschiedlicher cDNA-Stränge unbekannter Sequenz und Konzentration), hergestellt.

Die Cy5-markierte cDNA ist in 30 µl einer Lösung mit einem Natriumcitratpuffer gelöst. Die Puffer-Stammlösung („20 x SSC“ (standard sodium citrate)) ist eine Lösung von 3 M NaCl / 600 mM Natriumacetat bei pH 7.5, woraus die übrigen Pufferlösungen durch entsprechende Verdünnung hergestellt werden („1 x SSC“ entsprechend 150 mM NaCl / 15 mM Natriumcitrat, pH 7.5). Die hergestellte cDNA in Hybridisierungspuffer („4 x SSC“, 50 % Formamid, 1 % Tween20<sup>TM</sup>) wird in ein Probenbehälter mit einem Array aus diskreten Messbereichen mit immobilisierten cDNA's auf einer Sensorplattform, entsprechend Beispiel 1A, gefüllt, um für einen Zeitraum von 16 Stunden die Hybridisierung von cDNA's als Analyten in dieser Probe mit komplementären Sequenzen von in den Messbereichen immobilisierten cDNA's („capture probes“) zu ermöglichen. Um eine möglichst hohe Spezifität bei der Hybridisierung zu erreichen, d.h. Hybridisierung zwischen nicht vollständig komplementären Strängen oder sogar vollständig unspezifische Hybridisierung weitestmöglich zu verhindern, wird der Hybridisierung unter „stringenten Bedingungen“ (beispielsweise erhöhter Temperatur nur wenig unterhalb Schmelzpunktes der jeweiligen DNA, hier bei

42°C) durchgeführt. Anschliessend wird zur Steigerung der Selektivität zusätzlich „stringent gewaschen“: zunächst 7 Minuten lang in „1 x SSC“ /0.1% SDS, bei 65 °C, dann 7 Minuten lang in „0.1 x SSC“ /0.1% SDS („sodium dodecyl sulfate“) bei 65 °C und anschliessend zweimal jeweils 7 Minuten lang in „0.1 x SSC“ bei 65 °C. Unter zunehmend „stringenten Waschbedingungen“ ist dabei zu verstehen, dass die Dissoziation von Hybriden aus nicht vollständig komplementären cDNA-Sequenzen mit abnehmender Konzentration positiver Ionen des Puffers und mit abnehmender Detergentien-Konzentration gefördert und somit die Selektivität des Verfahrens weiter erhöht wird.

Nach Abschluss des Hybridisierungsschritts und der beschriebenen nachfolgenden Waschschritte wird die Sensorplattform mit der damit zusammengefügt Polycarbonatplatte in einen „Metaträger“, wie vorangehend beschrieben (Beispiel 1A) eingefügt und dann zur Bestimmung der Lumineszenzintensitäten aus den Messbereichen, insbesondere infolge dort gebundener Cy5-markierter cDNA's als Analyten, sowie zur orts aufgelösten Bestimmung der verfügbaren Anregungslichtintensität in ein erfindungsgemässes analytisches System (Beispiel 1C) eingesetzt und vermessen. Das Probenbehältnis ist während der Messung mit Hybridisierungspuffer („4 x SSC“, 50 % Formamid, 1 % Tween20<sup>TM</sup>) gefüllt.

### **1C: Analytisches System und Messverfahren zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten**

Der Anregungslicht-Strahlengang des für dieses Beispiel benutzen optischen Systems, als Bestandteil eines erfindungsgemässen analytischen Systems, ermöglicht die sequentielle, oder bei geeignet genauer Vorjustierung des optischen Systems und geeigneten physikalischen Parametern (insbesondere Koppelwinkeln für die jeweiligen Anregungswellenlängen) der benutzten Sensorplattform, sogar gleichzeitige Einstrahlung und Einkopplung von Anregungslicht verschiedener Wellenlängen in die wellenleitende Schicht (a) einer erfindungsgemässe Sensorplattform über deren Einkoppelgitter. Das Anregungslicht wird, unter Verwendung eines Linsensystems mit einer Zylinderlinse oder eines geeigneten diffraktiven optischen Elements sowie einer oder mehrerer zusätzlicher Blenden, zu einem Strahlbündel spaltförmigen Querschnitts (senkrecht zur optischen Achse) aufgeweitet, dessen Ausdehnung im Einstrahlungsquerschnitt auf der Sensorplattform, parallel zu deren Gitterlinien,

nahezu vollständig dem innerhalb eines Probenbehältnisses befindlichen Abschnitt des Einkoppelgitters entspricht.

Wesentlicher Bestandteil des Anregungslicht-Strahlenganges ist ein Multifacettenprisma, als Beispiel für eine optische Komponente mit mehreren diskreten Facetten zur Strahlumlenkung.

Für die Schicht- und Gitterparameter der in Beispiel 1A beschriebenen Sensorplattform beträgt der Einkoppelwinkel für Anregungslicht von 492 nm etwa + 18.2° und von 635 nm etwa -10° (mit Luft als Medium über dem Koppelgitter). Das Multifacettenprisma ist so gestaltet, dass bei geeigneter Ausrichtung der bei 492 nm bzw. 635 nm emittierenden Laser als Anregungslichtquellen auf unterschiedliche Eintrittsfacetten dieses Prismas das aus der Austrittsfacette austretende Licht die Einkoppelbedingung für beide Wellenlängen erfüllt und kein messbarer Strahlversatz zwischen den Anregungslichtstrahlen der beiden unterschiedlichen Wellenlängen auf dem Einkoppelgitter (c) der Sensorplattform auftritt. Dieses ermöglicht eine Einkopplung bei den unterschiedlichen Wellenlängen ohne Veränderung der Positionierung der Sensorplattform.

Von der Sensorplattform abgestrahltes Licht aus dem Bereich der Messfläche innerhalb eines Probenbehältnisses auf der Sensorplattform (Gesichtsfeld ca. 6 mm x 8 mm) wird mit einem Tandem-Objektiv gesammelt und auf eine CCD-Kamera mit einem CCD-Chip (aktive Fläche ca. 5 mm x 7 mm mit 512 x 766 Pixeln, Pixelgrösse 9 µm) fokussiert. Je nach Einstellung des Abbildungssystems ermöglicht dieses eine Ortsauflösung von ca. 10 µm bis 20 µm.

Zwischen den beiden Hälften des Tandem-Objektivs, in einem im wesentlichen parallelen Teil (d.h. weniger als 10° divergenten oder konvergenten) Teil des Emissionsstrahlenganges können unterschiedliche Interferenzfilter, zur Erfassung des von der Sensorplattform ausgehenden Lichts bei unterschiedlichen Wellenlängen, positioniert werden.

Die Anregung der auf der Sensorplattform aufgetragenen „Referenzierungslabel“ (FluorX™, Fluoreszenzmaximum bei 520 nm) erfolgt bei 492 nm, die Bestimmung von deren Fluoreszenz unter Verwendung eines Interferenzfilters mit maximaler Transmission

im Bereich zwischen 500 und 550 nm. Die „Nachweislabel“ (Cy5, Fluoreszenzmaximum bei 667 nm) werden mithilfe einer Laserdiode bei 635 nm angeregt; für die entsprechende Fluoreszenzbestimmung wird ein Interferenzfilter mit maximaler Transmission von 650 bis 700 nm verwendet.

Die Fluoreszenzmessungen bei den beiden unterschiedlichen Wellenlängen werden in diesem Beispiel sequentiell durchgeführt, wobei zu Beginn jeder Wellenlänge die Anordnung jeweils auf maximale Einkopplung bei der entsprechenden Wellenlänge justiert wird. Wie oben beschrieben, ist bei einer entsprechend genauen Vorjustierung des Systems jedoch auch die gleichzeitige Anregung beider Fluoreszenzen bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen möglich, so dass zur Bestimmung der unterschiedlichen Fluoreszenzen lediglich ein Wechsel der Filter im Emissionsstrahlengang erforderlich ist. Dabei wird jeweils in einer Aufnahme der CCD-Kamera das Emissionslicht von allen innerhalb eines Probenbehältnisses gelegenen Messbereichen erfasst.

## **1D: Bearbeitung und Referenzierung der Messdaten**

### ***(i) Bestimmung der Signalintensitäten aus den Messbereichen (Spots)***

Die mittlere Signalintensität aus den Messbereichen (Spots) zur Bindung und zum Nachweis von Analytmolekülen anhand einer potentiell erzeugten Fluoreszenz von „Nachweislabel“ (in diesem Beispiel Cy5), wird mithilfe einer Bildanalyse-Software bestimmt.

Die Rohdaten von den einzelnen Pixeln der Kamera stellen eine zweidimensionale Matrix digitalisierter Messwerte dar, mit der gemessenen Intensität als Messwert eines einzelnen Pixels entsprechend der auf ihn abgebildeten Fläche auf der Sensorplattform. Für die Auswertung der Daten wird zunächst manuell ein zweidimensionales (Koordinaten-) Netz über die Bildpunkte (Pixelwerte) gelegt derart, dass jeder Spot in ein individuelles zweidimensionales Netzelement fällt. Darin wird jedem Spot ein geometrisch möglichst gut anzupassender „Auswertebereich“ (area of interest, AOI) zugeordnet. Diese AOIs können eine beliebige geometrische Form haben, beispielsweise kreisförmig sein. Durch die Bildanalyse-Software wird der Ort der einzelnen AOIs individuell als Funktion der Signalintensität der einzelnen Pixel angepasst und optimiert. Dabei kann, abhängig von der Vorgabe des Benutzers, der zu Beginn eingestellte Radius der AOIs erhalten bleiben oder der Form und Grösse der fluoreszierenden Spots neu angepasst werden. Als mittlere Bruttosignalintensität eines

jeden Spots wird beispielsweise das arithmetische Mittel der Pixelwerte (Signalintensitäten) innerhalb eines gewählten AOIs bestimmt.

Die Hintergrundsignale werden bestimmt aus den gemessenen Signalintensitäten zwischen den Spots. Dazu kann beispielsweise eine Schar weiterer Kreise, welche konzentrisch sind mit einem betreffenden kreisförmigen Spot, aber grösseren Radius besitzen, bestimmt werden. Selbstverständlich müssen die Radien dieser konzentrischen Kreise kleiner als die Abstände zwischen benachbarten Spots gewählt werden. Für die Hintergrundbestimmung kann dann beispielsweise der Bereich zwischen dem AOI und dem ersten konzentrischen Kreis verworfen und der Bereich zwischen diesem ersten konzentrischen und einem zweiten nachfolgenden konzentrischen Kreis grösseren Radius als Bereich (AOI) zur Hintergrundsignalbestimmung festgelegt werden. Es ist auch möglich, AOIs zwischen benachbarten Spots, vorzugsweise in der Mitte zwischen ihnen, als AOIs zur Hintergrundsignalbestimmung zu definieren. Daraus kann dann in analoger Weise wie oben die mittlere Hintergrundsignalintensität beispielsweise als das arithmetische Mittel der Pixelwerte (Signalintensitäten) innerhalb eines hierfür gewählten AOIs bestimmt werden. Die mittlere Nettosignalintensität kann als Differenz zwischen der lokalen mittleren Brutto- und der lokalen mittleren Hintergrundsignalintensität bestimmt werden.

***(ii) Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten aus ausgewiesenen Bereichen für die orts aufgelöste Referenzierung der Anregungslichtintensität mithilfe von „Referenzierungslabeln“***

Für die Bestimmung und Normalisierung der Lichtintensitäten wird die mittlere Brutto-signalintensität eines jeden Spots bei der zweiten Wellenlänge bestimmt. Dazu werden in ähnlicher Weise wie oben AOIs festgelegt. Die AOIs zur Referenzierung eines bestimmten Messbereichs können beispielsweise aus den Bereichen zwischen diesem Spot und den nächsten benachbarten Spots gewählt werden oder auch identisch mit dem AOI des betreffenden Spots für den Analytnachweis sein. Im letzteren Fall sollten die Absorptions- und Emissionsspektren der „Referenzierungs-“ und der „Nachweislabel“ nicht oder nur möglichst wenig überlappen, um eine Verfälschung der Fluoreszenzmessungen aus den Bereichen der Spots, beispielsweise durch Energietransfer zwischen den Fluorophoren unterschiedlicher Anregungs- und Emissionswellenlängen, zu minimieren.

Als mittlere Bruttosignalintensität eines jeden festgelegten AOIs zur Referenzierung wird beispielsweise wiederum das arithmetische Mittel der Pixelwerte (Signalintensitäten) innerhalb dieses AOIs bestimmt.

***(iii) Referenzierung der gemessenen Signalintensitäten bei der Wellenlänge des „Nachweislabels“***

Als lokaler Korrekturfaktor zur orts aufgelösten Referenzierung der verfügbaren Anregungslichtintensität wird der Quotient aus der lokalen durchschnittlichen Intensität eines AOIs für die Referenzierung und beispielsweise dem arithmetischen Mittel aller derartiger AOIs des untersuchten Arrays gebildet. Mit diesem lokalen Korrekturfaktor wird dann die wie oben berechnete mittlere Nettosignalintensität des AOIs des zugehörigen Messbereichs (Spots) multipliziert. Auf diese Weise werden die berechneten Nettosignalintensitäten für die AOIs aller Spots des Arrays korrigiert.

**Beispiel 2:**

**2A: Sensorplattform**

Es wird eine gleichartige Sensorplattform wie in Beispiel 1A beschrieben verwendet.

Zur Vorbereitung auf die Immobilisierung der biochemischen oder biologischen oder synthetischen Erkennungselemente wird die Sensorplattformen zuerst mit Isopropanol, dann mit konzentrierter  $H_2SO_4$ , 2.5% Ammoniumperoxodisulfat im Ultraschallgerät gereinigt und anschliessend mit 0.5 mM Dodecylmonophosphat (Ammoniumsalz) 2 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Lösung ständig gerührt wird. Dabei bildet sich mittels „Self-Assembly“ eine homogene, hydrophobe Oberfläche (Schritt 1).

Erzeugung diskreter Messbereiche (Schritt 2): 8 verschiedene (primäre) Antikörper (gegen die Interleukine IL#1 bis IL#8) werden in einer Konzentration von 50-150  $\mu g/ml$  in phosphatgepufferter Salzlösung (pH 7.4), die zusätzlich geeignete Additive zum Erhalt der Funktionalität der immobilisierten Proteine enthält, mittels eines Inkjet-Spotters aufgetragen

und getrocknet. Der Durchmesser der Spots, mit einem Abstand (Zentrum-zu-Zentrum) von 0.35 mm, beträgt im Mittel 0.15 mm. Acht verschiedene Antikörper zur Erkennung von Zytokinen, im speziellen von unterschiedlichen Interleukinen, werden in jeweils 20 Reihen eines Einzelarrays mit insgesamt 160 Spots verwendet. Um aus jeder Einzelmessung pro zuzuführender Probe zugleich bereits Daten zur statistischen Assayreproduzierbarkeit zu erhalten, werden pro Array jeweils 20 Messbereiche mit gleichen Interleukin-Antikörpern als biologische Erkennungselemente erzeugt.

Es werden 6 derartige Arrays gleicher Geometrie auf der Sensorplattform im Raster von 9 mm (in einer Spalte angeordnet) erzeugt.

Im nächsten Schritt (Schritt 3) wird zur späteren Ermöglichung der orts aufgelösten Bestimmung der Anregungslichtintensität und gleichzeitig zur weitestgehenden Unterbindung von unspezifischen Wechselwirkungen mit den nachzuweisenden Analyten oder anderer Bestandteile einer aufzubringenden Probe, d.h. zur Erzeugung einer gegenüber den Analyten ausserhalb der Messbereiche „chemisch neutralen“ Oberfläche, die Oberfläche des bespotteten Chips mit 3% BSA in PBS-Puffer pH 7.4, welches zusätzlich mit Cy7 (Amersham Pharmacia) markiertes BSA enthält, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch bildet sich in den unbesetzten Bereichen der Sensorplattform, in denen im vorangegangenen Schritt 2 keine spezifischen Erkennungselemente immobilisiert wurden, eine fluoreszenzfähige Passivierungsschicht aus.

Auf die so vorbereitete Sensorplattform wird die beschriebene Polycarbonatplatte so aufgebracht, dass die einzelnen Probenbehältnisse gegeneinander fluidisch dicht abgeschlossen sind und die erzeugten Protein-Micro-Arrays mit dem zugehörigen Einkoppelgittern (c) sich jeweils innerhalb eines der 6 Probenbehältnisse befinden.

### **2B: Assaydurchführung**

Zur spezifischen Erkennung der nachzuweisenden Zytokine wird das Format eines Sandwich-Assays gewählt. Für die gewählten Zytokine (Interleukine IL#1 bis IL#8) werden 6 Kalibrationslösungen, welche jedes der 8 Interleukine in gleicher Konzentration in PBS-Puffer pH 7.4 mit einem Zusatz von 0.1% Serumalbumin und 0.05% Tween20 enthalten (Interleukinmengen 0, 50, 125, 250, 500, 1000 pg/ml), hergestellt. Dann werden die indi-



viduellen Konzentrationslösungen mit einem Gemisch, bestehend aus den entsprechenden (8 verschiedenen) spezifischen biotinylierten sekundären anti-Interleukin-Antikörpern (jeweils 1-2-nanomolar) sowie Cy5-markiertem Streptavidin (5-15 nM) eine Stunde lang bei 37°C vorinkubiert. Dann werden je 50 µl der 6 individuellen Kalibrationslösungen in jeweils eine der 6 Flusszellen auf der Sensorplattform gefüllt und für weitere 2 Stunden bei 37°C mit dem jeweiligen Array auf der Sensorplattform inkubiert, so dass die im Vorinkubationsschritt gebildeten Komplexe aus den jeweiligen Interleukinen, spezifischen sekundären, biotinylierten anti-Interleukin-Antikörpern und Cy-5 markiertem Streptavidin an die in den diskreten Messbereichen (Spots) immobilisierten primären anti-Interleukin-Antikörper binden können.

Nach Abschluss des Bindungsschrittes werden die Flusszellen mit Puffer (phosphatgepufferte Salzlösung mit einem Zusatz von 0.1% Serumalbumin und 0.05% Tween20) gewaschen.

Danach wird die Sensorplattform mit der damit zusammengefügte Polycarbonatplatte in einen „Metaträger“, wie vorangehend beschrieben (Beispiel 1A) eingefügt und, nach einer weiteren 15-minütigen Inkubationszeit (zur Equilibrierung bei Raumtemperatur) in Puffer, in ein erfindungsgemässes analytisches System (siehe Beispiel 1C bzw. 2C) eingesetzt und vermessen.

## **2C: Analytisches System und Messverfahren zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten sowie zur ortsangelösten Referenzierung der Anregungslichtintensität**

Es wird ein analytisches System verwendet, wie es in Beispiel 1C beschrieben wurde.

Für die Schicht- und Gitterparameter der in Beispiel 2A beschriebenen Sensorplattform beträgt der Einkoppelwinkel für Anregungslicht von 635 nm etwa  $-10^\circ$  (mit Luft als Medium über dem Koppelgitter).

Sowohl die Anregung der auf der Sensorplattform aufgetragenen „Referenzierungslabel“ (Cy7), als auch der Nachweislabel“ (Cy5, Fluoreszenzmaximum bei 667 nm) erfolgt bei

635 nm, die Bestimmung von deren Fluoreszenz unter Verwendung von Interferenzfiltern mit maximaler Transmission im Bereich von 670 nm („Nachweislabel“) beziehungsweise 780 nm („Referenzierungslabel“).

Zu Beginn der Messung wird die Anordnung auf maximale Einkopplung bei der für „Nachweislabel“ und „Referenzierungslabel“ gemeinsamen Anregungswellenlänge von 635 nm justiert. Dann werden sequentiell die Fluoreszenzmessungen bei den beiden unterschiedlichen Emissionswellenlängen durchgeführt, wobei zwischen den Messungen bei den unterschiedlichen Emissionswellenlängen lediglich ein Wechsel der genannten Filter im Emissionsstrahlengang erforderlich ist. Dabei wird jeweils in einer Aufnahme der CCD-Kamera das Emissionslicht von allen innerhalb eines Probenbehältnisses gelegenen Messbereichen erfasst. Aus den Aufnahmen der 6 Arrays in den 6 diskreten Probenbehältnissen, denen unterschiedliche Kalibrationslösungen zugeführt wurden, können dann (auf die lokale Anregungsintensität referenzierte) Kalibrationskurven zum Nachweis aller 8 Interleukine erstellt werden (siehe unten).

## **2D: Bearbeitung und Referenzierung der Messdaten**

### ***(i) Bestimmung der Signalintensitäten aus den Messbereichen (Spots) mit Hilfe von „Nachweislabeln“***

Die mittlere Signalintensität aus den Messbereichen (Spots) zur Bindung und zum Nachweis von Analytmolekülen anhand einer potentiell erzeugten Fluoreszenz von „Nachweislabeln“ (in diesem Beispiel Cy5, mit Fluoreszenzmaximum nahe 670 nm), wird mithilfe einer Bildanalyse-Software bestimmt.

Die Rohdaten von den einzelnen Pixeln der Kamera stellen eine zweidimensionale Matrix digitalisierter Messwerte dar, mit der gemessenen Intensität als Messwert eines einzelnen Pixels entsprechend der auf ihn abgebildeten Fläche auf der Sensorplattform. Für die Auswertung der Daten wird zunächst manuell ein zweidimensionales (Koordinaten-) Netz über die Bildpunkte (Pixelwerte) gelegt derart, dass jeder Spot in ein individuelles zweidimensionales Netzelement fällt. Darin wird jedem Spot ein geometrisch möglichst gut anzupassender „Auswertebereich“ (area of interest, AOI) zugeordnet. Diese AOIs können eine beliebige geometrische Form haben, beispielsweise kreisförmig sein. Durch die Bildanalyse-Software wird der Ort der einzelnen AOIs individuell als Funktion der Signalintensität der

einzelnen Pixel angepasst und optimiert. Dabei kann, abhängig von der Vorgabe des Benutzers, der zu Beginn eingestellte Radius der AOIs erhalten bleiben oder der Form und Grösse der fluoreszierenden Spots neu angepasst werden. Als mittlere Bruttosignalintensität eines jeden Spots wird beispielsweise das arithmetische Mittel der Pixelwerte (Signalintensitäten) innerhalb eines gewählten AOIs bestimmt.

Die Hintergrundsignale werden bestimmt aus den gemessenen Signalintensitäten bei der Wellenlänge der Emission des „Nachweislabels“ (670 nm) zwischen den Spots. Voraussetzung für eine korrekte Bestimmung des Hintergrundsignals ist dabei, dass in den dazu ausgewählten Bereichen auf der Sensorplattform (welche bedeckt sind mit der fluoreszenten „Passivierungsschicht“) kein Beitrag zu einer Fluoreszenz bei der Emissionswellenlänge des „Nachweislabels“ erfolgt. Für die geometrische Festlegung der Bereiche zur Bestimmung der Hintergrundsignale kann beispielsweise eine Schar weiterer Kreise, welche konzentrisch sind mit einem betreffenden kreisförmigen Spot, aber grösseren Radius besitzen, bestimmt werden. Selbstverständlich müssen die Radien dieser konzentrischen Kreise kleiner als die Abstände zwischen benachbarten Spots gewählt werden. Für die Hintergrundbestimmung kann dann beispielsweise der Bereich zwischen dem AOI und dem ersten konzentrischen Kreis verworfen und der Bereich zwischen diesem ersten konzentrischen und einem zweiten nachfolgenden konzentrischen Kreis grösseren Radius als Bereich (AOI) zur Hintergrundsignalbestimmung festgelegt werden. Es ist auch möglich, AOIs zwischen benachbarten Spots, vorzugsweise in der Mitte zwischen ihnen, als AOIs zur Hintergrundsignalbestimmung zu definieren. Daraus kann dann in analoger Weise wie oben die mittlere Hintergrundsignalintensität beispielsweise als das arithmetische Mittel der Pixelwerte (Signalintensitäten) innerhalb eines hierfür gewählten AOIs bestimmt werden. Die mittlere Nettosignalintensität kann als Differenz zwischen der lokalen mittleren Brutto- und der lokalen mittleren Hintergrundsignalintensität bestimmt werden.

***(ii) Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten aus ausgewiesenen Bereichen für die orts aufgelöste Referenzierung der Anregungslichtintensität mithilfe von „Referenzierungslabeln“***

Für die Ermittlung und Normalisierung der Anregungslichtintensitäten wird die mittlere Bruttosignalintensität zwischen einzelnen Spots analog zur zuvor beschriebenen Bestim-

mung des Hintergrundsignals, aber nun bei der zweiten Emissionswellenlänge von 780 nm bestimmt. Als mittlere Bruttosignalintensität eines jeden festgelegten AOIs zur Referenzierung wird beispielsweise wiederum das arithmetische Mittel der Pixelwerte (Signalintensitäten) innerhalb dieses AOIs bestimmt.

***(iii) Referenzierung der gemessenen Signalintensitäten bei der Wellenlänge des „Nachweislabels“***

Als lokaler Korrekturfaktor zur orts aufgelösten Referenzierung der verfügbaren Anregungslichtintensität wird der Quotient aus der lokalen durchschnittlichen Intensität eines AOIs für die Referenzierung und beispielsweise dem arithmetischen Mittel aller derartiger AOIs des untersuchten Arrays gebildet. Mit diesem lokalen Korrekturfaktor wird dann die wie oben berechnete mittlere Nettosignalintensität des AOIs des zugehörigen Messbereichs (Spots) multipliziert. Auf diese Weise werden die berechneten Nettosignalintensitäten für die AOIs aller Spots des Arrays korrigiert.

## Patentansprüche

1. Kit zum gleichzeitigen qualitativen und / oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten, umfassend
  - eine Sensorplattform
  - mindestens ein Array von in diskreten Messbereichen (d) direkt, oder über eine Haftvermittlungsschicht, auf der Sensorplattform immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zur spezifischen Erkennung und / oder Bindung besagter Analyten und / oder spezifischen Wechselwirkung mit besagten Analyten,
  - eine Passivierungsschicht aus gegenüber den Analyten "chemisch neutralen" Verbindungen oder einer passivierten Haftvermittlungsschicht mit einer gegenüber den Analyten „chemisch neutralen“ Oberfläche zwischen den Messbereichen,

wobei mit der Passivierungsschicht oder der passivierten Haftvermittlungsschicht in einer möglichst homogenen Verteilung über die Sensorplattform lumineszenzmarkierte Moleküle assoziiert sind, welche der orts aufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen oder in deren Umgebung verfügbaren Anregungslichtintensität dienen.
2. Kit zum gleichzeitigen qualitativen und / oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten, umfassend
  - eine Sensorplattform
  - eine auf der Sensorplattform aufgebrachte dünne Schicht (g)
  - mindestens ein Array von in diskreten Messbereichen (d) direkt, oder über eine Haftvermittlungsschicht, auf der Schicht (g) immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zur spezifischen Erkennung und / oder Bindung besagter Analyten und / oder spezifischen Wechselwirkung mit besagten Analyten,
  - eine Passivierungsschicht aus gegenüber den Analyten "chemisch neutralen" Verbindungen oder einer passivierten Haftvermittlungsschicht mit einer gegenüber den Analyten „chemisch neutralen“ Oberfläche zwischen den Messbereichen,

wobei mit auf der Sensorplattform aufgetragenen Schicht (g) in einer möglichst homogenen Verteilung über die Sensorplattform lumineszenzmarkierte Moleküle assoziiert sind, welche der orts aufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen oder in deren Umgebung verfügbaren Anregungslichtintensität dienen.

3. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 2, dadurch gekennzeichnet, dass die gegenüber den Analyten "chemisch neutralen" Verbindungen ausgewählt sind aus den Gruppen, die von Albuminen, insbesondere Rinderserumalbumin oder Humanserumalbumin, Casein, unspezifischen, polyklonalen oder monoklonalen, artfremden oder empirisch für den oder die nachweisenden Analyten unspezifischen Antikörpern (insbesondere für Immunoassays), Detergentien – wie beispielsweise Tween 20 -, nicht mit zu analysierenden Polynukleotiden hybridisierender, fragmentierter natürlicher oder synthetischer DNA, wie beispielsweise ein Extrakt von Herings- oder Lachssperma (insbesondere für Polynukleotid-Hybridisierungsassays), oder auch ungeladenen, aber hydrophilen Polymeren, wie beispielsweise Polyethylenglycole oder Dextrane, gebildet werden.
4. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 3, dadurch gekennzeichnet, dass die besagten immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente ausgewählt sind aus der Gruppe, die von Nukleinsäuren (beispielsweise DNA, RNA, Oligonukleotiden) und Nukleinsäureanaloge (z. B. PNA), mono- oder polyklonalen Antikörpern, Peptiden, Enzymen, Aptameren, synthetischen Peptidstrukturen, löslichen, membrangebundenen und aus einer Membran isolierten Proteinen, wie beispielsweise Rezeptoren, deren Liganden, Antigenen für Antikörper, "Histidin-Tag-Komponenten" und deren Komplexbildungspartnern, durch chemische Synthese erzeugten Kavitäten zur Aufnahme molekularer Imprints, etc. gebildet wird.
5. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Analytnachweis auf der Bestimmung der Änderung einer oder mehrerer Lumineszenzen beruht.
6. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht in einer Auflichtanordnung eingestrahlt wird.
7. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 6, dadurch gekennzeichnet, dass das mit den Messbereichen in Kontakt stehende Material der Sensorplattform innerhalb einer Tiefe von

mindestens 200 nm von den Messbereichen bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparent oder absorbierend ist.

8. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht in einer Transmissionslichtanordnung eingestrahlt wird.
9. Kit nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Material der Sensorplattform bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparent ist.
10. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorplattform als ein optischer Wellenleiter ausgebildet ist, welcher vorzugsweise im wesentlichen planar ist.
11. Kit nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorplattform ein optisch transparentes Material aus der Gruppe umfasst, die von Silikaten, z. B. Glas oder Quarz, transparenten thermoplastischen oder spritzbaren Kunststoff, beispielsweise Polycarbonat, Polyimid, Acrylaten, insbesondere Polymethylmethacrylat, oder Polystyrolen gebildet wird.
12. Kit nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorplattform einen optischen Dünnschichtwellenleiter mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) umfasst.
13. Kit nach einem der Ansprüche 10 – 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von einer oder mehrerer Lichtquellen eingekoppelt wird in den optischen Wellenleiter mittels eines Verfahrens, welches ausgewählt ist aus der Gruppe, die von Stirnflächenkopplung, Einkopplung über angebrachte optische Fasern als Lichtleiter, Prismenkopplung, Gitterkopplung oder evaneszenter Kopplung durch Überlappung des evaneszenten Feldes besagten optischen Wellenleiters mit dem evaneszenten Feld eines weiteren, damit in Nahfeldkontakt gebrachten Wellenleiters gebildet wird.
14. Kit nach einem der Ansprüche 10 – 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Einkopplung des Anregungslichts von einer oder mehreren Lichtquellen in den optischen Wellenleiter

mittels eines damit in Kontakt stehenden optischen Koppellements erfolgt, welches ausgewählt ist aus der Gruppe von optischen Fasern als Lichtleiter, Prismen, gegebenenfalls über eine brechungsindexanpassende Flüssigkeit, und Gitterkopplern.

15. Kit nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von einer oder mehreren Lichtquellen in die Schicht (a) mittels einer oder mehrerer in der Schicht (a) modulierten Gitterstrukturen (c) eingekoppelt wird.
16. Kit nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorplattform gleichförmige, unmodulierte Bereiche der Schicht (a) umfasst, welche vorzugsweise in Ausbreitungsrichtung des über eine Gitterstruktur (c) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts angeordnet sind.
17. Kit nach einem der Ansprüche 15 – 16, dadurch gekennzeichnet, dass Gitterstrukturen (c) der Einkopplung von Anregungslicht zu den Messbereichen (d) und / oder der Auskopplung von in die Schicht (a) rückgekoppeltem Lumineszenzlicht dienen.
18. Kit nach einem der Ansprüche 15 – 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorplattform eine Vielzahl von Gitterstrukturen (c) gleicher oder unterschiedlicher Periode mit gegebenenfalls daran anschliessenden gleichförmigen, unmodulierten Bereichen der Schicht (a) auf einem gemeinsamen, durchgehenden Substrat umfasst.
19. Kit nach einem der Ansprüche 15 – 18, dadurch gekennzeichnet, dass jedem in Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts nachfolgenden Array von Messbereichen eine für dieses Array spezifische Gitterstruktur (c) zur Auskopplung dieses Anregungslichts zugeordnet ist, wobei senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts die Gitterstrukturen spezifisch für einzelne Arrays ausgebildet sein können oder sich auch über die ganze Sensorplattform in dieser Richtung erstrecken können.
20. Kit nach einem der Ansprüche 15 - 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorplattform eine Überlagerung von 2 oder mehreren Gitterstrukturen unterschiedlicher Periodizität mit zueinander paralleler oder nicht paralleler, vorzugsweise nicht paralleler Ausrichtung der Gitterlinien umfasst, welche der Einkopplung von Anregungslicht



- unterschiedlicher Wellenlänge dient, wobei im Falle von 2 überlagerten Gitterstrukturen deren Gitterlinien vorzugsweise senkrecht zueinander ausgerichtet sind.
21. Kit nach einem der Ansprüche 15 – 20, dadurch gekennzeichnet, dass eine Gitterstruktur (c) oder eine Überlagerung mehrerer Gitterstrukturen in der Schicht (a) im wesentlichen über die gesamte Fläche der Sensorplattform moduliert ist.
22. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 21, dadurch gekennzeichnet, dass auf der Sensorplattform optisch oder mechanisch erkennbare Markierungen zur Erleichterung der Justierung in einem optischen System und / oder zur Verbindung mit Probenbehältnissen als Teil eines analytischen Systems aufgebracht sind.
23. Kit nach einem der Ansprüche 12 - 22, dadurch gekennzeichnet, dass sich zwischen den optisch transparenten Schichten (a) und (b) und in Kontakt mit Schicht (a) eine weitere optisch transparente Schicht (b') mit niedrigerem Brechungsindex als dem der Schicht (a) und einer Stärke von 5 nm – 10 000 nm, vorzugsweise von 10 nm - 1000 nm, befindet.
24. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 22, dadurch gekennzeichnet, dass zur Immobilisierung der biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente in den diskreten Messbereichen auf der Sensorplattform eine Haftvermittlungsschicht (f) mit einer Stärke von vorzugsweise weniger als 200 nm, besonders bevorzugt von weniger als 20 nm aufgebracht ist, und dass die Haftvermittlungsschicht (f) vorzugsweise eine chemische Verbindung aus den Gruppen umfasst, die Silane, funktionalisierte Silane, Epoxide, funktionalisierte, geladene oder polare Polymere und "selbst-organisierte passive oder funktionalisierte Mono- oder Mehrfachschichten" umfassen.
25. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 24, dadurch gekennzeichnet, dass räumlich getrennte Messbereiche (d) durch räumlich selektive Aufbringung von biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen auf besagter Sensorplattform erzeugt werden, vorzugsweise unter Verwendung eines oder mehrerer Verfahren aus der Gruppe von Verfahren, die von "Ink jet spotting", mechanischem Spotting mittels Stift, Feder oder Kapillare, "micro contact printing", fluidischer Kontaktierung der Messbereiche mit den biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen

durch deren Zufuhr in parallelen oder gekreuzten Mikrokanälen, unter Einwirkung von Druckunterschieden oder elektrischen oder elektromagnetischen Potentialen" sowie photochemischen oder photolithographischen Immobilisierungsverfahren gebildet werden.

26. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Dichte der in diskreten Messbereichen immobilisierten Erkennungselemente zum Nachweis unterschiedlicher Analyten auf unterschiedlichen Messbereichen so ausgewählt ist, dass die Signale beim Nachweis verschiedener Analyten in einem gemeinsamen Array von gleicher Größenordnung sind, d.h., dass gegebenenfalls die zugehörigen Kalibrationskurven für die gleichzeitig durchzuführenden Analytbestimmungen ohne eine Änderung der elektronischen oder optoelektronischen Systemeinstellungen aufgenommen werden können.
27. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 26, dadurch gekennzeichnet, dass Arrays von Messbereichen aufgeteilt sind in Segmente von ein oder mehreren Messbereichen zur Bestimmung von Analyten und Bereichen zwischen diesen Messbereichen oder zusätzlichen Messbereichen zu Zwecken einer zusätzlichen physikalischen Referenzierung, wie beispielsweise des Einflusses von Änderungen äusserer Parameter, wie beispielsweise der Temperatur, sowie zu Zwecken der Referenzierung des Einflusses zusätzlicher physikalisch-chemischer Parameter, wie beispielsweise unspezifischer Bindung an die Sensorplattform von Bestandteilen einer aufgetragenen Probe.
28. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 27, dadurch gekennzeichnet, dass in einer 2-dimensionalen Anordnung bis zu 100 000 Messbereiche angeordnet sind und ein einzelner Messbereich eine Fläche von  $0.001 - 6 \text{ mm}^2$  einnimmt.
29. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 28, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberseite der Sensorplattform mit den darauf erzeugten Messbereichen über der optisch transparenten Schicht (a) mit einem weiteren Körper derart zusammengebracht ist, dass zwischen der Sensorplattform als Grundplatte und besagtem Körper eine oder mehrere räumliche Aussparungen zur Erzeugung eines oder mehrerer gegeneinander fluidisch abgedichteter Probenbehälter erzeugt werden, in denen jeweils ein oder mehrere Messbereiche oder Segmente oder Arrays von Messbereichen liegen.

30. Kit mit einer Anordnung von Probenbehältnissen gemäss Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenbehältnisse als gegeneinander fluidisch abgedichtete Flusszellen mit jeweils mindestens einem Zulauf und mindestens einem Ablauf ausgebildet sind und gegebenenfalls zusätzlich mindestens ein Ablauf jeder Flusszelle in ein mit dieser Flusszelle fluidisch verbundenes Reservoir führt, welches aus der Flusszelle austretende Flüssigkeit aufnimmt.
31. Kit nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenbehältnisse auf der den Messbereichen gegenüberliegenden Seite des mit der Sensorplattform als Grundplatte zusammengebrachten Körpers offen sind.
32. Kit nach einem der Ansprüche 29 - 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Anordnung von Probenbehältnissen 2 – 2000, vorzugsweise 2 – 400, besonders bevorzugt 2 – 100 einzelne Probenbehältnisse umfasst.
33. Kit nach einem der Ansprüche 29 - 32, dadurch gekennzeichnet, dass das Raster (Aufeinanderfolge in Zeilen und / oder Spalten) der Probenbehältnisse dem Raster der Wells einer Standardmikrotiterplatte entspricht.
34. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 33, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich Vorkehrungen zur Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten erzeugten Lumineszenzen die Zugabe von Kalibrationslösungen mit bekannten Konzentrationen der nachzuweisenden Analyten auf eine vorbestimmte Anzahl von Arrays umfassen.
35. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 34, dadurch gekennzeichnet, dass in einem oder mehreren Arrays jeweils mehrere Messbereiche mit dort in einer unterschiedlichen, kontrollierten Dichte immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zum Nachweis eines für diese Messbereiche gemeinsamen Analyten vorgesehen sind.
36. Kit nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, dass bei bekannter Konzentrationsabhängigkeit der Bindungssignale zwischen einem Analyten und seinen biologischen oder

biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen und einer ausreichend grossen "Variation" dieser in unterschiedlicher kontrollierter Dichte in verschiedenen Messbereichen eines Arrays immobilisierten Erkennungselemente bereits mittels Zugabe einer einzigen Kalibrationslösung zu diesem Array eine Kalibrationskurve für diesen Analyten erstellt werden kann.

37. Verwendung eines Kits nach einem der Ansprüche 1 – 36 in einem analytischen System zur Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen.
38. Verfahren zum gleichzeitigen qualitativen und / oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten mit einem Kit nach einem der Ansprüche 1 – 36, dadurch gekennzeichnet, dass zur orts aufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen (d) auf der Sensorplattform, als Bestandteil des Kits, oder in der Umgebung dieser Messbereiche verfügbaren Anregungslichtintensität die Lumineszenzsignale von möglichst homogen über die Sensorplattform verteilten lumineszenzmarkierten Molekülen, welche mit einer auf besagter Sensorplattform aufgetragenen Passivierungsschicht oder passivierten Haftvermittlungsschicht, zur Minimierung unspezifischer Bindung zwischen den Messbereichen, assoziiert sind, bestimmt werden.
39. Verfahren zum gleichzeitigen qualitativen und / oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten mit einem Kit nach einem der Ansprüche 2 – 36, dadurch gekennzeichnet, dass zur orts aufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen (d) auf der Sensorplattform, als Bestandteil des Kits, oder in der Umgebung dieser Messbereiche verfügbaren Anregungslichtintensität die Lumineszenzsignale von möglichst homogen über die Sensorplattform verteilten lumineszenzmarkierten Molekülen, welche mit einer auf besagter Sensorplattform aufgetragenen dünnen Schicht (g) assoziiert sind, bestimmt werden.
40. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 - 39, dadurch gekennzeichnet, dass der quantitative und / oder qualitative Nachweis besagter Vielzahl von Analyten die Verwendung einer oder mehrerer signalgebender Komponenten als Label umfasst, welche ausgewählt sein können aus der Gruppe, die von beispielsweise Lumineszenzlabeln, insbesondere lumineszenten Interkalatoren oder "molecular beacons", Absorptionslabeln, Massen-

labeln, insbesondere Metallkolloiden oder Plastikbeads, Spin-Labeln, wie ESR- oder NMR-Labeln, radioaktiven Labeln gebildet wird.

41. Verfahren nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass die Referenzierung der in den Messbereichen oder in deren Umgebung verfügbaren Anregungslichtintensität und / oder ein gegebenenfalls auf Absorptions- und / oder Lumineszenznachweis beruhender Analytnachweis auf Einsatz von Labels mit gleicher oder unterschiedlicher Absorptions- und / oder Lumineszenzwellenlänge beruhen.
42. Verfahren nach einem der Ansprüche 40 – 41, dadurch gekennzeichnet, dass der Analytnachweis auf der Bestimmung der Änderung einer oder mehrerer Lumineszenzen beruht.
43. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 – 42, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht in einer Auflichtanordnung eingestrahlt wird.
44. Verfahren nach einem der Ansprüche 48 – 42, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht in einer Transmissionslichtanordnung eingestrahlt wird.
45. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 – 44, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorplattform als ein optischer Wellenleiter ausgebildet ist, welcher vorzugsweise im wesentlichen planar ist, und dass das Anregungslicht von einer oder mehrerer Lichtquellen eingekoppelt wird in den optischen Wellenleiter mittels eines Verfahrens, welches ausgewählt ist aus der Gruppe, die von Stirnflächenkopplung, Einkopplung über angebrachte optische Fasern als Lichtleiter, Prismenkopplung, Gitterkopplung oder evaneszenter Kopplung durch Überlappung des evaneszenten Feldes besagten optischen Wellenleiters mit dem evaneszenten Feld eines weiteren, damit in Nahfeldkontakt gebrachten Wellenleiters gebildet wird.
46. Verfahren nach Anspruch 45, dadurch gekennzeichnet, dass die Einkopplung des Anregungslichts von einer oder mehreren Lichtquellen in den optischen Wellenleiter mittels eines damit in Kontakt stehenden optischen Koppelements erfolgt, welches ausgewählt ist aus der Gruppe von optischen Fasern als Lichtleiter, Prismen, gegebenenfalls über eine brechungsindexanpassende Flüssigkeit, und Gitterkopplern.

47. Verfahren nach Anspruch 45, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorplattform einen optischen Dünnschichtwellenleiter mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) umfasst und dass das Anregungslicht von einer oder mehreren Lichtquellen in die Schicht (a) mittels einer oder mehrerer in der Schicht (a) modulierten Gitterstrukturen (c) eingekoppelt wird.
48. Verfahren nach Anspruch 47, dadurch gekennzeichnet, dass eine oder mehrere auf besagte Analyten zu untersuchende flüssige Proben mit den Messbereichen auf der Sensorplattform in Kontakt gebracht werden, eine oder mehrere im Nahfeld der Schicht (a) erzeugte Lumineszenzen aus den mit besagter Probe oder besagten Proben in Kontakt gebrachten Messbereichen, als Folge der Bindung eines oder mehrerer Analyten an die in besagten Messbereichen immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente oder der Wechselwirkung zwischen besagten Analyten und besagten immobilisierten Erkennungselementen, gemessen werden und gegebenenfalls zusätzlich in orts aufgelöster Weise die in besagten Messbereichen oder in deren Umgebung verfügbare Anregungslichtintensität referenziert wird.
49. Verfahren nach einem der Ansprüche 47 - 48, dadurch gekennzeichnet, dass (1) die isotrop abgestrahlte Lumineszenz oder (2) in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelte und über Gitterstrukturen (c) ausgekoppelte Lumineszenz oder Lumineszenzen beider Anteile (1) und (2) gleichzeitig gemessen werden.
50. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 - 49, dadurch gekennzeichnet, dass zur Erzeugung der Lumineszenzen der „Referenzierungslabel“ und der „Nachweislabel“ Lumineszenzfarbstoffe oder lumineszente Nanopartikel als Lumineszenzlabel verwendet werden, die bei einer Wellenlänge zwischen 300 nm und 1100 nm angeregt werden können und emittieren.
51. Verfahren nach Anspruch 50, dadurch gekennzeichnet, dass das „Nachweislabel“ an den Analyten oder in einem kompetitiven Assay an einen Analogen des Analyten oder in einem mehrstufigen Assay an einen der Bindungspartner der immobilisierten

biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen oder an die biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente gebunden ist.

52. Verfahren nach einem der Ansprüche 50 – 51, dadurch gekennzeichnet, dass ein zweites oder noch weitere „Nachweislabel“ mit gleicher oder unterschiedlicher Anregungswellenlänge wie das erste „Nachweislabel“ und gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden
53. Verfahren nach einem der Ansprüche 41 – 52, dadurch gekennzeichnet, dass die einen oder mehreren Lumineszenzen und / oder Bestimmungen von Lichtsignalen bei der Anregungswellenlänge polarisationsselektiv vorgenommen werden, wobei vorzugsweise die einen oder mehreren Lumineszenzen bei einer anderen Polarisierung als der des Anregungslichts gemessen werden.
54. Verfahren nach einem der Ansprüche 42 - 53, dadurch gekennzeichnet, dass neben der Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen Änderungen des effektiven Brechungsindex auf den Messbereichen bestimmt werden.
55. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 – 54, dadurch gekennzeichnet, dass die Dichte der in diskreten Messbereichen immobilisierten Erkennungselemente zum Nachweis unterschiedlicher Analyten auf unterschiedlichen Messbereichen so ausgewählt ist, dass die Signale beim Nachweis verschiedener Analyten in einem gemeinsamen Array von gleicher Größenordnung sind, d.h., dass die zugehörigen Kalibrationskurven für die gleichzeitig durchzuführenden Analytbestimmungen ohne eine Änderung der elektronischen oder optoelektronischen Systemeinstellungen aufgenommen werden können.
56. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 – 55, dadurch gekennzeichnet, dass Arrays von Messbereichen aufgeteilt sind in Segmente von ein oder mehreren Messbereichen zur Bestimmung von Analyten und Bereichen zwischen diesen Messbereichen oder zusätzlichen Messbereichen zu Zwecken der physikalischen Referenzierung, wie beispielsweise der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität oder des Einflusses von Änderungen äußerer Parameter, wie beispielsweise der Temperatur, sowie zu Zwecken der Referenzierung des Einflusses zusätzlicher physikalisch-chemischer Parameter, wie

beispielsweise unspezifischer Bindung an die Sensorplattform von Bestandteilen einer aufgetragenen Probe.

57. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 – 56, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Messbereiche eines Segments oder eines Arrays der Bestimmung desselben Analyten zugeordnet sind und deren immobilisierte biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente unterschiedlich hohe Affinitäten zu besagtem Analyten aufweisen.
58. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 – 57, dadurch gekennzeichnet, dass die eine oder mehreren Proben mit einer Mischung aus den verschiedenen Nachweisreagentien zur Bestimmung der in besagten Proben nachzuweisenden Analyten vorinkubiert werden und diese Mischungen dann in einem einzigen Zugabeschritt den dafür vorgesehenen Arrays auf der Sensorplattform zugeführt werden.
59. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 - 58, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Nachweisreagentien, wie beispielsweise sekundärer Nachweisantikörper und / oder Label und optional zusätzlicher labelmarkierter Nachweisreagentien in einem Sandwich-Immunoassay, so ausgewählt ist, dass die Signale beim Nachweis verschiedener Analyten in einem gemeinsamen Array von gleicher Größenordnung sind, d.h., dass die zugehörigen Kalibrationskurven für die gleichzeitig durchzuführenden Analytbestimmungen ohne eine Änderung der elektronischen oder optoelektronischen Systemeinstellungen aufgenommen werden können.
60. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 - 59, dadurch gekennzeichnet, dass die Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten erzeugten Lumineszenzen die Zugabe von einer oder mehreren Kalibrationslösungen mit bekannten Konzentrationen besagter zu bestimmender Analyten auf die gleichen oder andere Messbereiche oder Segmente von Messbereichen oder Arrays von Messbereichen auf einer Sensorplattform umfasst, denen im gleichen oder einem separaten Zugabeschritt die eine oder die mehreren zu untersuchenden Proben zugeführt werden.



61. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 - 59, dadurch gekennzeichnet, dass die Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen den Vergleich der Lumineszenzintensitäten nach Zugabe einer unbekannten und einer Kontroll-Probe, wie beispielsweise einer "wild type"-DNA-Probe und einer "mutant DNA"-Probe, umfasst.
62. Verfahren nach Anspruch 61, dadurch gekennzeichnet, dass die Zugabe der unbekannten Probe und der Kontrollprobe zu unterschiedlichen Arrays erfolgt.
63. Verfahren nach Anspruch 61, dadurch gekennzeichnet, dass die Zugabe der unbekannten Probe und der Kontrollprobe sequentiell zu dem gleichen Array erfolgt.
64. Verfahren nach Anspruch 63, dadurch gekennzeichnet, dass die unbekannte Probe und die Kontrollprobe gemischt werden und dann die Mischung einem oder mehreren Arrays einer Sensorplattform zugeführt wird.
65. Verfahren nach einem der Ansprüche 61 - 65, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion der in der unbekannten und der Kontrollprobe nachzuweisenden Analyten mittels Lumineszenzlabels von unterschiedlicher Anregungs- und / oder Lumineszenzwellenlänge für die unbekannte und die Kontrollprobe erfolgt.
66. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 - 65, dadurch gekennzeichnet, dass in einem oder mehreren Arrays jeweils mehrere Messbereiche mit dort in einer unterschiedlichen, kontrollierten Dichte immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zum Nachweis eines für diese Messbereiche gemeinsamen Analyten vorgesehen sind.
67. Verfahren nach Anspruch 66, dadurch gekennzeichnet, dass bei bekannter Konzentrationsabhängigkeit der Bindungssignale zwischen einem Analyten und seinen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen und einer ausreichend grossen "Variation" dieser in unterschiedlicher kontrollierter Dichte in verschiedenen Messbereichen eines Arrays immobilisierten Erkennungselemente bereits mittels

Zugabe einer einzigen Kalibrationslösung zu diesem Array eine Kalibrationskurve für diesen Analyten erstellt werden kann.

68. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 – 67 zur gleichzeitigen oder sequentiellen, quantitativen oder qualitativen Bestimmung eines oder mehrerer Analyten aus der Gruppe von Antikörpern oder Antigenen, Rezeptoren oder Liganden, Chelatoren oder "Histidin-tag-Komponenten", Oligonukleotiden, DNA- oder RNA-Strängen, DNA- oder RNA-Analoga, Enzymen, Enzymcofaktoren oder Inhibitoren, Lektinen und Kohlehydraten.
69. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 – 68, dadurch gekennzeichnet, dass die zu untersuchenden Proben natürlich vorkommende Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Lymphe oder Urin oder Eigelb oder optisch trübe Flüssigkeiten oder Gewebeflüssigkeiten oder Oberflächenwasser oder Boden- oder Pflanzenextrakte oder Bio- oder Syntheseprozessbrühen oder aus biologischen Gewebeteilen oder aus Zellkulturen oder -extrakten entnommen sind.
70. Verwendung eines Kits nach einem der Ansprüche 1 – 36 und / oder eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 38 – 69 für quantitative oder qualitative Analysen zur Bestimmung chemischer, biochemischer oder biologischer Analyten in Screeningverfahren in der Pharmaforschung, der Kombinatorischen Chemie, der Klinischen und Präklinischen Entwicklung, zu Echtzeitbindungsstudien und zur Bestimmung kinetischer Parameter im Affinitätsscreening und in der Forschung, zu qualitativen und quantitativen Analytbestimmungen, insbesondere für die DNA- und RNA-Analytik, für die Erstellung von Toxizitätsstudien sowie für die Bestimmung von Gen- oder Protein-Expressionsprofilen sowie zum Nachweis von Antikörpern, Antigenen, Pathogenen oder Bakterien in der pharmazeutischen Produktentwicklung und -forschung, der Human- und Veterinärmedizin, der Agrochemischen Produktentwicklung und -forschung, der symptomatischen und präsymptomatischen Pflanzendiagnostik, zur Patientenstratifikation in der pharmazeutischen Produktentwicklung und für die therapeutische Medikamentenauswahl, zum Nachweis von Pathogenen, Schadstoffen und Erregern, insbesondere von Salmonellen, Prionen, Viren und Bakterien, in der Lebensmittel- und Umweltanalytik.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/12787

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/543 G01N21/77 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 517 516 A (CIBA CORNING DIAGNOSTICS CORP) 9 December 1992 (1992-12-09) cited in the application the whole document ---	1-70
X	US 5 738 992 A (SCHULKIND RICHARD L ET AL) 14 April 1998 (1998-04-14) cited in the application the whole document ---	1-70
A	BARIE N ET AL.: "Covalent photolinker-mediated immobilisation of an intermediate dextran layer to polymer coated surfaces for biosensing applications" BIOSENSORS & BIOELECTRONICS, ELSEVIER SCIENCE B.V., vol. 13, 1998, pages 885-860, XP001069100 ---	
-/--		



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 April 2002

Date of mailing of the international search report

08/05/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Thiele, U

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 01/12787

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KUNZ R E: "Miniature integrated optical modules for chemical and biochemical sensing" SENSORS AND ACTUATORS B, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, CH, vol. 38, no. 1-3, 1997, pages 13-28, XP004083666 ISSN: 0925-4005 the whole document</p>	
A	<p>HOMOLA J ET AL: "Surface plasmon resonance sensors: review" SENSORS AND ACTUATORS B, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, CH, vol. 54, no. 1-2, 25 January 1999 (1999-01-25), pages 3-15, XP004163207 ISSN: 0925-4005</p>	
T	<p>HONGBO B ET AL.: "Protein contact printing for a surface plasmon resonance biosensor with on-chip referencing" SENSORS AND ACTUATORS B, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, CH, 'Online! vol. 74, 2001, pages 91-99, XP002196405 Retrieved from the Internet: &lt;URL:www.elsevier.nl/locate/sensorb&gt; 'retrieved on 2002-04-17!</p>	
T	<p>WIKI M ET AL.: "Compact integrated optical sensor system" BIOSENSORS &amp; BIOELECTRONICS, ELSEVIER SCIENCE B.V., 'Online! vol. 16, 2001, pages 37-45, XP002196406 Retrieved from the Internet: &lt;URL:www.elsevier.nl/locate/sensorb&gt; 'retrieved on 2002-04-17!</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/12787

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0517516	A	09-12-1992	CA 2069537 A1	08-12-1992
			DE 69230420 D1	20-01-2000
			DE 69230420 T2	03-08-2000
			EP 0517516 A1	09-12-1992
			JP 7198594 A	01-08-1995
			US 5525466 A	11-06-1996
			US 5738992 A	14-04-1998
<hr/>				
US 5738992	A	14-04-1998	US 5525466 A	11-06-1996
			CA 2069537 A1	08-12-1992
			DE 69230420 D1	20-01-2000
			DE 69230420 T2	03-08-2000
			EP 0517516 A1	09-12-1992
			JP 7198594 A	01-08-1995
<hr/>				

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/12787

## A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N33/543 G01N21/77 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 517 516 A (CIBA CORNING DIAGNOSTICS CORP) 9. Dezember 1992 (1992-12-09) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-70
X	US 5 738 992 A (SCHULKIND RICHARD L ET AL) 14. April 1998 (1998-04-14) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-70
A	BARIE N ET AL.: "Covalent photolinker-mediated immobilisation of an intermediate dextran layer to polymer coated surfaces for biosensing applications" BIOSENSORS & BIOELECTRONICS, ELSEVIER SCIENCE B.V., Bd. 13, 1998, Seiten 885-860, XP001069100	
-/-		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. April 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

08/05/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Thiele, U

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/12787

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	KUNZ R E: "Miniature integrated optical modules for chemical and biochemical sensing" SENSORS AND ACTUATORS B, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, CH, Bd. 38, Nr. 1-3, 1997, Seiten 13-28, XP004083666 ISSN: 0925-4005 das ganze Dokument ---	
A	HOMOLA J ET AL: "Surface plasmon resonance sensors: review" SENSORS AND ACTUATORS B, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, CH, Bd. 54, Nr. 1-2, 25. Januar 1999 (1999-01-25), Seiten 3-15, XP004163207 ISSN: 0925-4005 ---	
T	HONGBO B ET AL.: "Protein contact printing for a surface plasmon resonance biosensor with on-chip referencing" SENSORS AND ACTUATORS B, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, CH, 'Online! Bd. 74, 2001, Seiten 91-99, XP002196405 Gefunden im Internet: <URL:www.elsevier.nl/locate/sensorb> 'gefunden am 2002-04-17! ---	
T	WIKI M ET AL.: "Compact integrated optical sensor system" BIOSENSORS & BIOELECTRONICS, ELSEVIER SCIENCE B.V., 'Online! Bd. 16, 2001, Seiten 37-45, XP002196406 Gefunden im Internet: <URL:www.elsevier.nl/locate/sensorb> 'gefunden am 2002-04-17! -----	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In internationales Aktenzeichen

PCI/EP 01/12787

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0517516 A	09-12-1992	CA 2069537 A1	08-12-1992
		DE 69230420 D1	20-01-2000
		DE 69230420 T2	03-08-2000
		EP 0517516 A1	09-12-1992
		JP 7198594 A	01-08-1995
		US 5525466 A	11-06-1996
		US 5738992 A	14-04-1998
US 5738992 A	14-04-1998	US 5525466 A	11-06-1996
		CA 2069537 A1	08-12-1992
		DE 69230420 D1	20-01-2000
		DE 69230420 T2	03-08-2000
		EP 0517516 A1	09-12-1992
		JP 7198594 A	01-08-1995



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**